

**DESARROLLO DE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN**  
**Y ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS Y**  
**COMPUESTOS FENÓLICOS EN JABOTICABA**  
**(*Myrciaria cauliflora*)**



**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

***AUTOR: CELIA MERA MORILLO***

***TUTORES: GERARDO FERNÁNDEZ BARBERO***

***MIGUEL PALMA LOVILLO***

**GRADO EN QUÍMICA**

***CURSO 2014/2015***

***JULIO 2015***

**1. RESUMEN**

**2. SUMMARY**

**3. INTRODUCCIÓN**

**3.1 Características de la Jaboticaba**

**3.2 Compuestos fenólicos**

**3.3 Antocianinas**

**3.4 Técnicas de extracción**

**3.4.1 Extracción asistida por ultrasonidos**

**3.4.2 Extracción mediante fluidos presurizados**

**3.5 Técnicas de separación y análisis**

**3.5.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

**3.5.2 Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)**

**3.6 Técnicas de identificación y cuantificación de polifenoles y antocianinas**

**3.6.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis**

**3.6.2 Espectrometría de masas (HPLC-MS; UHPLC-MS)**

**4. JUSTIFICACIÓN**

**5. MATERIALES Y MÉTODOS**

**5.1 Disolventes y reactivos**

**5.2 Material vegetal**

**5.3 Extracción asistida por ultrasonidos**

**5.3.1 Equipo de extracción**

**5.3.2 Procedimiento de extracción**

**5.4 Extracción mediante fluidos presurizados**

**5.4.1 Equipo de extracción**

**5.4.2 Procedimiento de extracción**

**5.5 Espectroscopia UV-Vis**

**5.5.1 Equipo UV-Vis**

**5.5.2 Procedimiento de Folin-Ciocalteu**

**5.6 UHPLC-Q-ToF-MS**

**5.7 HPLC-UV-Vis**

**5.8 Diseño de experimento de tipo Box-Behnken**

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Extracción asistida por ultrasonidos**

#### **6.1.1 Optimización mediante diseño de experimento Box-Behnken**

#### **6.1.2 Condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos**

##### **6.1.2.1 Tiempo de extracción**

##### **6.1.2.2 Repetitividad y reproducibilidad del método**

#### **6.1.3 Condiciones óptimas de extracción para antocianinas**

##### **6.1.3.1 Tiempo de extracción**

##### **6.1.3.2 Repetitividad y reproducibilidad del método**

### **6.2 Extracción mediante fluidos presurizados**

#### **6.2.1 Optimización mediante diseño de experimento Box-Behnken**

#### **6.2.2 Condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos**

##### **6.2.2.1 Tiempo de extracción**

##### **6.2.2.2 Repetitividad y reproducibilidad del método**

#### **6.2.3 Condiciones óptimas de extracción para antocianinas**

##### **6.2.3.1 Tiempo de extracción**

##### **6.2.3.2 Repetitividad y reproducibilidad del método**

## **7 CONCLUSIONES**

## **8 BIBLIOGRAFÍA**

## **9 APÉNDICES**

## 1. RESUMEN

La jaboticaba es el fruto del árbol jaboticabo (*Myrciaria cauliflora*), que habita en gran parte del territorio de Brasil y Paraguay. Dicho fruto es conocido por sus características organolépticas y por sus valores nutricionales. La Jaboticaba presenta una cantidad considerable de compuestos de alto interés biológicos como son compuestos antioxidantes y compuestos anti-cancerígenos entre los que destacan compuestos fenólicos y antocianinas.

La jaboticaba ha despertado en los últimos años el interés de muchos autores, realizando estudios basados en la determinación y cuantificación de los compuestos con interés biológicos que presenta, además de sus propiedades beneficiosas para la salud. Por el contrario, se han realizado pocos estudios sobre la optimización en la extracción de estos compuestos. Debido al creciente consumo de este fruto, tanto en modo natural, como en alimentos elaborados a partir de la jaboticaba, se hace necesario disponer de técnicas analíticas de extracción rápidas y cuantitativas para su determinación, para el control de la calidad de sus productos, así como para el control de fraudes.

En este trabajo se han desarrollado dos técnicas de extracción enfocadas al análisis de compuestos fenólicos totales y antocianinas presentes en la Jaboticaba. Las técnicas estudiadas han sido la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción mediante fluidos presurizados (PLE). Dichas extracciones se han realizado sobre una muestra de jaboticaba triturada.

Para realizar el desarrollo de las técnicas de extracción se ha utilizado un diseño de experimento tipo Box- Behnken empleando 6 variables independientes en ambas técnicas y como variable respuesta se emplearon la concentración de antocianinas totales por un lado y la concentración de compuestos fenólicos totales por otro. Tras la obtención de las condiciones óptimas de cada método, se realizaron estudios del tiempo óptimo de extracción además del estudio de la repetitividad y reproducibilidad de cada método.

La identificación de las antocianinas presentes en la jaboticaba se ha llevado a cabo mediante el empleo de la cromatografía líquida de ultra eficacia acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS). El análisis de las antocianinas identificadas se realizó mediante cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un detector de UV-Vis (UHPLC-UV-Vis) con detección a 520 nm. Las antocianinas identificadas y analizadas fueron: cianidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido. Los compuestos fenólicos se determinaron mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

En la extracción asistida por ultrasonidos, como variables independientes se emplearon: porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, relación masa de muestra : volumen de disolvente, amplitud de ultrasonidos y ciclo de extracción. Tras la obtención de las condiciones óptimas, se obtuvo que el parámetro más influyente de extracción tanto para compuestos fenólicos totales como antocianinas totales era el porcentaje de metanol. El tiempo óptimo de extracción para ambos métodos en las condiciones óptimas fue de 10 minutos. Los métodos presentaron una alta repetitividad y reproducibilidad ( $DER < 5\%$ ).

En el empleo de la técnica de extracción mediante fluidos presurizados se procedió, de idéntica manera, empleando como variables independientes el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, presión de extracción, volumen de lavado y tiempo de purga. Las variables que más influyen en la extracción de estos compuestos son el pH y porcentaje de metanol en el disolvente de extracción. El tiempo óptimo de extracción para ambos métodos en las condiciones óptimas fue de 10 minutos. Los métodos presentaron una alta repetitividad y reproducibilidad ( $DER < 5\%$ ).

Tras la optimización de ambas técnicas de extracción, éstas se aplicaron a dos muestras reales de jaboticaba (una pulpa y una mermelada de jaboticaba). Tras los resultados obtenidos en ambas matrices se determinó que la extracción mediante fluidos presurizados es más eficiente que la extracción asistida por ultrasonidos.

## 2. SUMMARY

Jaboticaba is the fruit from jaboticabo tree (*Myrciaria Cauliflora*) which lives in gran part of the territory of Brazil and Paraguay. This fruit is known because of its nutritional properties and organoleptics characteristics. The jaboticaba also presents a great number of compounds with a great biological interest such as anthocyanins and phenolic compounds which are antioxidants and anti-carcinogenic compounds.

In the last years, the jaboticaba has awakened the interest of many authors. In the literature, there are many studies focused on the identification and quantification of biological compounds from jaboticaba apart from on its beneficial properties. However, there are only a few studies about the extraction methods of these compounds. Due to people's increased consumption of this fruit, in a natural or processed form, it is necessary to develop fast and quantitative extraction techniques in order to identify these compounds, improve their quality and avoid food frauds.

In the present study, four extraction techniques were developed, for anthocyanins and phenolic compounds in jabuticaba with Ultrasound Assisted Extraction (UAE) and Pressurized Liquid Extraction (PLE). These extractions techniques have been employed in a crushed jabuticaba pulp. An experimental design of response surface methodology (Box-Behnken) has been carried out. This experimental design employed six independent variables for both techniques and used as response variable the total anthocyanins concentration and the total phenolic compounds concentration. Once the optimal conditions for each extraction method were obtained, a study of the optimum extraction time, the repeatability and reproducibility of the method was performed.

The identification of the anthocyanins in jabuticaba was carried out by using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (Q-ToF-MS). The anthocyanins were analyzed by using Ultra High Performance Liquid Chromatography with UV-Vis detection at 520 nm (UHPLC-UV-Vis). The identified anthocyanins were cyanidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-glucoside. The phenolic compounds were determined using the Folin-Ciocalteu method.

In the ultrasound assisted extraction method, temperature, ultrasound amplitude and cycle, pH of the solvent, percentage of methanol in the extraction solvent and the mass-solvent volume ratio were employed as independent variables. Once the optimal extraction conditions were obtained, a study of the optimum extraction time, the repeatability and reproducibility of the method was also done. The most influential parameter in the extraction of both total phenolic compounds and total anthocyanins was the percentage of methanol in the extraction solvent. The optimum extraction time in both methods when using the optimal conditions, was 10 minutes. These two methods have presented a high repeatability and reproducibility for total phenolics and total anthocyanins (DER < 5%).

The variables studied in the development of the method by Pressurized Liquid Extraction technique were temperature, pressure, volume of cell wash, the purge time, the pH of the solvent and the percentage of methanol in the extraction solvent. After obtaining the optimal extraction conditions, it was observed that the most influential extraction parameter in both, total phenolic compounds and total anthocyanins, were the percentage of methanol in the extraction solvent and the pH of the solvent. The optimum extraction time in both methods was also 10 minutes. These two methods have presented a high repeatability and reproducibility for total phenolic compounds and for total anthocyanins as well (DER < 5%).

Once the four methods were developed, the applicability of these methods in real samples (jabuticaba pulp and jam) was tested. It was observed that Pressurized Liquid Extraction is the most effective technique for extracting anthocyanins and total phenolic compounds.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Características de la jaboticaba

La jaboticaba es una fruta producida por el árbol jaboticabo (*Myrciaria cauliflora*). Este árbol es nativo de Brasil y está ampliamente extendido por gran parte del territorio de Brasil y Paraguay, aunque puede también encontrarse aunque en menor proporción en zonas del norte de Argentina o Bolivia. El jaboticabo es un árbol de aspecto tortuoso, con muy pocas ramas, de corteza gruesa y un poco espinosa. Crece de forma natural en zonas sombrías a los pies de otras especies.

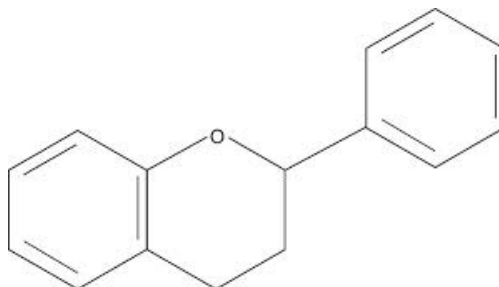
Sus frutos producen la impresión de estar pegados al tallo y se concentran en el tronco principal y las ramas gruesas de este árbol. Son verdes al nacer, pasando a una tonalidad morada y finalmente tornándose a un color prácticamente negro al madurar. Esta fruta presenta gran similitud con la uva tanto en forma como textura. El fruto tiene una forma redonda, de un diámetro comprendido entre 1.5 y 3.0 cm, con una piel de color negro-rojizo y con una pulpa blanquecina que es a la vez dulce y amarga y muy sabrosa. Generalmente contiene una semilla pero puede contener hasta 4 semillas en su interior.

El fruto se puede consumir de varias formas, ya sea fresco o procesado en mermelada, zumo, licor, helados o dulces. Este fruto es muy empleado en los países de producción debido a sus agradables características sensoriales que hacen a la jaboticaba muy adecuada como un producto comercial. El interés por este fruto está creciendo de forma exponencial en el ámbito económico y alimentario en Brasil, habiendo atraído el interés de la industria agroalimentaria. Este aumento de interés se debe a una gran aceptación por parte de los consumidores debido a su agradable sabor y a su gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud que presenta debido a la alta cantidad de compuestos de interés biológico que posee, destacando los compuestos fenólicos y las antocianinas. Estos compuestos hacen que estos frutos tengan acción en el tratamiento o la prevención de enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, diarreas, etc.<sup>1</sup>

La jaboticaba además de los nutrientes esenciales, contiene cantidades considerables de micronutrientes, como minerales, fibras, vitaminas y compuestos fenólicos.<sup>2</sup> Estudios recientes han demostrado que la adición del 1-2% de liofilizado de jaboticaba a una dieta normal mejora el estado oxidante probado sobre ratas sanas,<sup>3</sup> efecto que podría atribuirse a la cantidad de antocianinas presentes.

### 3.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias de naturaleza química variada que se encuentran presentes de un modo significativo en los alimentos de origen vegetal y que presentan una gran capacidad para captar radicales tóxicos debido a la presencia de grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos.<sup>4</sup> En los alimentos de origen vegetal, los compuestos fenólicos tienen un importante efecto en la calidad de éstos, ya que se encuentran directamente relacionados con las características sensoriales de estos alimentos, tales como el aroma, la astringencia y el color.<sup>5</sup> Desde el punto de vista de su estructura básica, los compuestos fenólicos se pueden clasificar en flavonoides y no flavonoides.<sup>6</sup> Los tipos flavonoides presentan un bajo peso molecular y se caracterizan por compartir una estructura base formada por el anillo flavano (Figura 1).



*Figura 1. Estructura del anillo flavano*

Entre las familias de compuestos pertenecientes a este grupo destacan los antocianos, flavonoles, flaván-3-oles, procianidinas, flavonas, flavanonas e isoflavonas, estando muchos de estos compuestos implicados en el color y sabor de muchos vegetales.

Con respecto a los compuestos fenólicos no flavonoides se incluyen los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos, los taninos hidrolizables y los estilbenos, que están presentes en numerosas frutas y verduras.

Existen numerosos estudios que demuestran que la presencia de compuestos fenólicos en la dieta es beneficiosa para la salud debido a su capacidad anticarcinógena y antimutágena, lo que se debe fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes.<sup>7,8</sup>

En la jaborcaba se han descrito un gran número de compuestos fenólicos entre los que destacan el ácido gálico, ácido ascórbico, 4,6-dihidroxifenil acetato, isoquercitrina, siriginina, quercimeritrina, quercetina, y varios derivados del ácido elágico, entre otros.



### **3.3. Antocianinas**

Los antocianos son un tipo de pigmento funcional responsable de una amplia gama de colores (rojo, púrpura o azul) presentes en verduras, flores, hojas y frutos. Se sabe que los antocianos actúan como antioxidantes fuertes,<sup>9</sup> presentando propiedades anti-inflamatorias,<sup>10</sup> actividades anti-mutagénicas y quimiopreventivas contra el cáncer,<sup>11</sup> etc. Generalmente en la naturaleza los antocianos están presentes en forma de antocianinas, es decir, como glucósidos de las antocianidinas, las cuales están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Sus funciones en las plantas son múltiples, desde la de protección de la radiación ultravioleta hasta la de atracción de insectos polinizadores.

Esta familia de compuestos pertenece a los compuestos fenólicos, clasificados dentro de los flavonoides, pero sus características tan diferenciadas con el resto de estos compuestos hacen que sean estudiadas como un grupo independiente.<sup>12</sup> Existe una gran variedad de antocianidinas en la naturaleza, pero solo 6 son las más comunes: cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina, malvidina y pelargonidina.<sup>13</sup> Las antocianinas son particularmente inestables, siendo especialmente sensibles a la luz, pH alcalino, y el calor. Para evitar la degradación durante la extracción de antocianos, las condiciones de extracción, generalmente más empleadas son: temperatura moderada y breve tiempo de extracción, obteniéndose unos resultados de extracción prácticamente cuantitativos.<sup>14</sup>

En la jaboticaba se han descrito las siguientes antocianinas: cianidina-3-O-glucósido; delfinidina-3-O-glucósido; peonidina-3-O-glucósido.<sup>11</sup>

### **3.4. Técnicas de extracción**

Recientemente el estudio de la composición de la jaboticaba ha cobrado una relevante importancia debido a la creciente demanda de esta fruta por los consumidores y por la industria agroalimentaria y farmacéutica, a causa de su gran cantidad y variedad de compuestos beneficiosos que presenta. En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas de extracción, como la extracción mediante fluidos supercríticos, la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción mediante fluidos presurizados o la extracción asistida por microondas para acelerar el proceso de extracción de compuestos de interés biológico en matrices vegetales, tanto con fines analíticos como con fines industriales.<sup>15</sup> Las técnicas clásicas de extracción de compuestos de interés en matrices vegetales con disolventes se basan en la correcta selección del disolvente acoplado al uso de temperatura y/o de agitación.

Previo a la extracción es preciso un proceso de triturado de la muestra con el objetivo de conseguir la máxima homogeneización de la muestra y elevar la superficie de contacto con el disolvente de extracción.

La extracción propiamente dicha envuelve la separación de los compuestos de interés, que se desean cuantificar, analizar, o bien purificar, separándolos de aquellos presentes en la matriz de la muestra que no resulten de interés, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado. En cada extracción se obtiene un complejo sistema de sustancias activas que puede contener sustancias lastres de diferente procedencia, lo que hace necesario optimizar las condiciones para maximizar la extracción de los compuestos de interés y minimizar los restantes. A continuación se detallaran las técnicas utilizadas en este estudio.

### **3.4.1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)**

Los ultrasonidos son ondas de presión que se transmiten por el material con el que están en contacto, provocando su contracción y posterior expansión, en consecuencia, transmisión de la energía por el material. La extracción asistida por ultrasonidos es una de las técnicas más versátiles por su simplicidad, bajo coste y por su amplio campo de aplicabilidad. En el caso de la jaboticaba se emplean disolventes líquidos y una matriz sólida (jaboticaba). Las ventajas de la optimización de un procedimiento de extracción mediante el empleo de ultrasonidos son el aumento del rendimiento de extracción, con una cinética más rápida, lo que conlleva menores tiempos de extracción y menor consumo de disolvente que las técnicas convencionales. En resumen esta técnica conlleva un ahorro económico, tanto de disolvente, cantidad de muestra y de tiempo.<sup>16</sup>

La aplicación de los ultrasonidos en un medio líquido provoca el fenómeno de la cavitación. Este es un proceso que ocurre en dos etapas: en una primera, se produce una descompresión del líquido dejando numerosos huecos. En la segunda, esta descompresión produce un gran aumento de presión que hace que vuelva al estado inicial (líquido) liberando energía, que de nuevo permite que se vuelva a producir una descompresión y así cerrar el ciclo. Por tanto, la extracción se ve favorecida y acelerada gracias a esta energía liberada. La extracción de los compuestos orgánicos que contiene la matriz vegetal como es el caso de la jaboticaba, se ve significativamente mejorada con el uso de ultrasonidos. El efecto mecánico que los ultrasonidos proporcionan, permite una mayor penetración del disolvente en el material intracelular y mejoran la transferencia de masa, teniendo la ventaja añadida que resulta de la ruptura de las paredes de las células facilitando la liberación de los analitos contenidas en ellas, mejorando de esta manera la extracción.<sup>17</sup>

El uso de esta técnica de extracción está muy extendido para la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos en un gran número de matrices vegetales, como la zarzamora,<sup>18</sup> arrayán,<sup>19</sup> naranja<sup>16</sup>, mango,<sup>20</sup> remolacha,<sup>21</sup> etc.

### 3.4.2. Extracción mediante fluidos presurizados (PLE)

La técnica de extracción mediante fluidos presurizados consiste en la extracción de la muestra empleando el fluido a temperaturas por encima de su punto de ebullición y utilizando presiones muy altas para mantenerlo en estado líquido, sin alcanzar el estado crítico. Esta técnica permite obtener extracciones cuantitativas. Es una técnica muy atractiva por utilizar tiempos cortos (aproximadamente de 15 minutos de extracción), usa volúmenes mínimos de disolvente, no necesita filtración tras la extracción y la instrumentación permite operar automáticamente. Entre sus inconvenientes destacan la necesidad de comprobar la estabilidad de los analitos a altas temperaturas y presiones, además del elevado coste del equipo.<sup>22</sup>

Hay varias razones por las que el uso de disolventes líquidos a elevadas temperaturas y presiones suele proporcionar un mejor rendimiento que las extracciones a temperaturas próximas a la ambiental y a presión atmosférica:

- **Los efectos de solubilidad:** El uso de altas temperaturas incrementa la capacidad del disolvente de solubilizar analitos.
- **Transferencia de masas:** Como resultado del incremento de la temperatura de extracción se consiguen velocidades de difusión más rápidas.
- **Interrupción del equilibrio de superficie:** El uso de altas temperaturas puede interrumpir las fuertes interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno y atracciones dipolares de las moléculas del soluto y los sitios activos de la matriz.<sup>23</sup>

Esta técnica se ha empleado ampliamente en la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos en un gran número de matrices vegetales como arándanos,<sup>23</sup> moras,<sup>24</sup> hojas de bambú negro,<sup>25</sup> cebollas rojas,<sup>26</sup> etc.

### **3.5. Técnicas de separación y análisis**

Una vez se hayan obtenido los extractos, el siguiente paso es llevar a cabo el análisis de los mismos. Para ello se necesita de técnicas analíticas de separación, identificación, cuantificación y análisis de los compuestos de interés biológicos presentes en los extractos obtenidos. Observando en la bibliografía, se comprueba que las técnicas analíticas más ampliamente empleadas para el análisis de compuestos fenólicos y antocianinas en extractos de plantas son tanto las técnicas espectroscópicas como la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).<sup>27, 28</sup>

#### **3.5.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

La HPLC es una técnica cromatográfica en columna cuya fase móvil es un líquido. Es la técnica de separación más ampliamente utilizada por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, separación de especies no volátiles y su gran aplicabilidad.<sup>29</sup> Su campo de aplicación abarca incluso a compuestos termosensibles, masas moleculares elevadas y compuestos de elevada polaridad. Su éxito se debe a las interacciones analito/fase móvil/fase estacionaria. Una desventaja que presenta es la necesidad de realizar varios experimentos para encontrar las condiciones óptimas de separación de la mezcla a separar, pero este pequeño inconveniente se satisface en casi todas las ocasiones por el apoyo de la bibliografía.

El funcionamiento de esta técnica se basa en la separación de los componentes de una mezcla en función de las interacciones químicas/físicas con la fase estacionaria de la columna. La fase móvil se desplaza por la columna a través de la fase estacionaria, los componentes se retienen y/o avanzan en función de las interacciones de dichas fases. Se distinguen distintos tipos en función de la columna, la polaridad del disolvente, de la fase estacionaria, ect.

Esta técnica es una de las más utilizadas por numerosos autores.<sup>30,31</sup> Como era de esperar, la HPLC ha sido empleada para el análisis de compuestos fenólicos y antocianinas en jaboticaba empleando distintos sistemas de detección como HPLC-DAD<sup>32,33</sup> y HPLC-Fluorescencia, como en otros vegetales y frutos como: granadas,<sup>34</sup> cebolla,<sup>35</sup> alcachofas,<sup>36</sup> açai<sup>37</sup>, ect.

### 3.5.2. Cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC)

La UHPLC, por sus siglas en inglés, es una nueva categoría de separación que aprovecha principios bien establecidos de cromatografía líquida usando partículas porosas de tamaño inferior a los 2  $\mu\text{m}$ . Estas partículas funcionan a velocidades lineales elevadas de fase móvil para producir separaciones rápidas con sensibilidad y resolución mayores. Debido a esto la UHPLC permite reducir notablemente los tiempos de análisis, a la par que satisface los criterios de aceptación del ensayo basándose en el número de platos, la resolución y la retención del analito.<sup>24</sup>

Esta técnica se ha empleado recientemente en el análisis de antocianinas y compuestos fenólicos en un gran número de vegetales como lechugas,<sup>38</sup> frutas buriti,<sup>39</sup> moras,<sup>24</sup> arándanos,<sup>23</sup> etc.

## 3.6. Técnicas de identificación y cuantificación de polifenoles y antocianinas

### 3.6.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis

La espectroscopia de absorción UV-Vis es una técnica espectroscópica que utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda está comprendida entre los 100 y los 800 nm (rango visible y zona próxima del ultravioleta a éste). Su efecto sobre la cuantificación de polifenoles totales es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y/o moleculares de la sustancia. Los máximos de absorción se deben a la presencia de cromóforos en la molécula.

Una de las aplicaciones más utilizadas de esta técnica es la determinación de la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en un extracto o en una muestra determinada. Los compuestos fenólicos totales se determinarán utilizando el método de *Folin-Ciocalteu*<sup>40</sup> que consiste en la adición del reactivo de *Folin-Ciocalteu* (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) dando lugar a un complejo de coloración azul que se mide en UV-Vis, generalmente a una longitud de onda de 750 nm. Dicha coloración se relaciona con la concentración de compuestos fenólicos a través de una recta de calibrado elaborada previamente. Esta técnica ha sido empleada para la cuantificación de compuestos fenólicos totales en un gran número de vegetales, vinos<sup>41</sup> y frutos como la grosella negra,<sup>42</sup> yacón,<sup>43</sup> cereza,<sup>44</sup> etc.

### **3.6.2. Espectrometría de masas (HPLC-MS; UHPLC-MS)**

La espectrometría de masas es un método de identificación y análisis que se basa en la determinación de las masas de los compuestos a analizar, lo que permite obtener información sobre su naturaleza, composición y estructura.

Esta técnica está basada en que los compuestos a analizar se ionizan, de forma que las especies portadoras de carga eléctrica son sometidas a un campo eléctrico / magnético que interferirá en sus trayectorias en una cámara sometida al vacío. El estudio de estas trayectorias permite determinar la relación masa-carga de estos iones, así como su naturaleza, aportando información sobre la determinación de un gran número de analitos de interés. Una desventaja de este método de análisis es que la espectrometría de masas es una técnica destructiva, por lo que en un sistema cromatográfico debe usarse en último lugar.

En la actualidad, ésta es una de las herramientas más utilizadas acoplada a equipos de cromatografía líquida de alta resolución en la identificación de compuestos fenólicos y antocianinas en un gran número de matrices como demuestran un gran número de publicaciones que analizan estos compuestos en chirimoyas,<sup>45</sup> limones,<sup>45</sup> papayas,<sup>45</sup> açai,<sup>46</sup> moras,<sup>47</sup> avellana,<sup>48</sup> etc.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La jaboticaba es un fruto con un alto potencial para aplicaciones industriales debido a su alto contenido en compuestos fenólicos y en antocianinas, unido a sus magníficas características organolépticas. Productos derivados de la jaboticaba como la jalea, pulpas, zumos, mermeladas, helados, harina de cáscara, fermentados y su licor, están ganando mucha importancia económica en muchas partes del mundo en los últimos años.<sup>49</sup> Este potencial, al igual que en otras frutas, no se debe solo a sus propiedades sensoriales o a las preferencias personales, sino por ser consideradas como una importante fuente de nutrientes y compuestos bioactivos.

El hecho de que su consumo y aplicaciones se estén extendiendo de una manera tan rápida, hace necesario que se desarrollen y optimicen técnicas de extracción y análisis de los compuestos de interés biológico en el fruto de la jaboticaba así como en alimentos elaborados a partir de ésta. Estos desarrollos responden a la necesidad de controlar las materias primas así como sus productos intermedios y productos acabados o procesados, disponiendo para ello de técnicas de extracción y análisis que minimicen los costes (tiempo de extracción y análisis, volumen de disolvente, cantidad de muestra, etc.). Todo ello hará más eficiente el control de calidad del proceso de producción, desde el control de la materia prima hasta el producto final, lo que conllevará a una mayor calidad del producto que llega al consumidor, así como al ahorro global del coste de producción.

Por todo lo expuesto anteriormente se plantea en este trabajo los siguientes objetivos individuales:

- Optimización de un método de extracción de antocianinas y compuestos fenólicos totales en jaboticaba mediante el empleo de la extracción asistida por ultrasonidos.
- Optimización de un método de extracción de antocianinas y compuestos fenólicos totales en jaboticaba mediante el empleo de la extracción mediante fluidos presurizados.
- Desarrollo de un método cromatográfico empleando la UHPLC-UV-Vis para la separación y cuantificación de las antocianinas de la jaboticaba.
- Aplicación de las técnicas desarrolladas al análisis de antocianinas y compuestos fenólicos en distintas matrices de jaboticaba y comparación entre métodos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Disolventes y reactivos**

Los disolventes empleados para las extracciones han sido agua y metanol (con pH modificado). El agua empleada ha sido de calidad Milli Q obtenida de un sistema de bi-destilación de agua Millipore (Bedford, MA, USA). El metanol (Fisher Scientific, Loughborough, UK) empleado ha sido de grado HPLC. La modificación del pH del metanol ha sido realizada con disoluciones 1M de ácido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España) e hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España), ambos de grado “Para Análisis”.

Los disolventes empleados en las separaciones cromatográficas han sido agua Milli Q, metanol (Fisher Scientific, Loughborough, UK) y ácido fórmico (Scharlau, Barcelona, España) siendo estos últimos de grado HPLC.

Para la medición de los fenólicos totales se ha empleado agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu (EMD Millipore, Darmstadt, Alemania), carbonato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España) y como patrón ácido gálico (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). El estándar de antocianos empleados ha sido el cloruro de pelargonidina (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

### **5.2. Material vegetal**

El material vegetal empleado en este trabajo ha consistido en frutos frescos de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) triturados. Las jaboticabas frescas han sido compradas en un supermercado de Sao Paulo. A las jaboticabas, aun frescas, se les quitaron las semillas interiores (1, 2, 3 e incluso 4 semillas) siendo la piel y pulpa de las mismas trituradas con una batidora convencional hasta conseguir una correcta homogeneización. La muestra una vez triturada se ha conservado a – 20 °C hasta su posterior análisis.

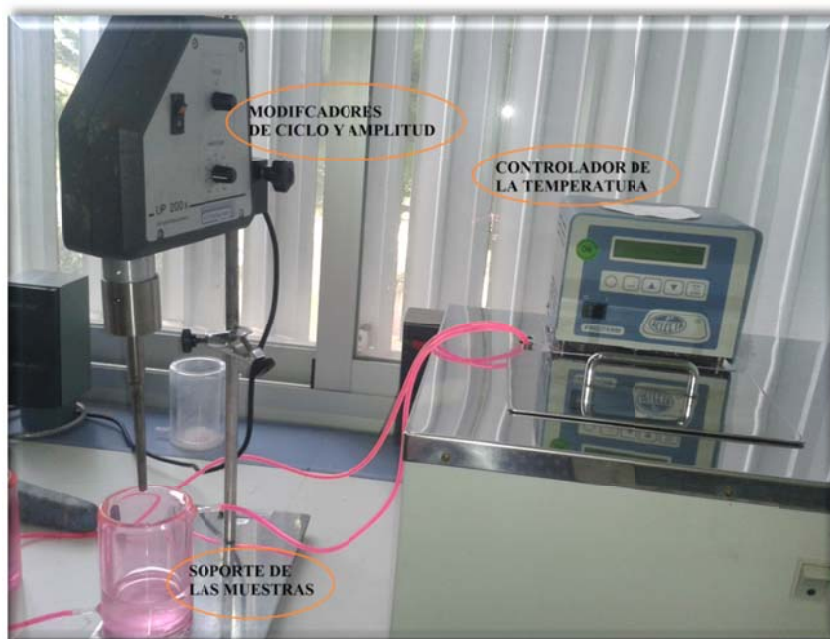
### **5.3. Extracción asistida por ultrasonidos**

#### **5.3.1. Equipo de extracción**

Las extracciones llevadas a cabo mediante ultrasonidos (UAE) tuvieron lugar con una sonda UP 200 S (Ultraschallprozessor Dr. Hielscher. GmbH, Berlin, Alemania), que permite modificaciones tanto en el



número de ciclos, como en la amplitud (potencia de ultrasonidos empleada). A la hora de realizar la extracción, esta sonda de ultrasonidos se introduce dentro de un “falcon” atemperado mediante un sistema de vasos de doble pared acoplados a un baño termostático que permite el control de la temperatura (FRIGITERM-10 J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España), tal como se observa en la Figura 2.



*Figura 2. Equipo de extracción asistida por ultrasonidos*

### 5.3.2. Procedimiento de extracción

Las variables de extracción que se han estudiado con este método han sido: Porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, relación masa de muestra : volumen de disolvente, amplitud de ultrasonidos (en % con respecto a la potencia máxima de la sonda (200W)) y ciclo de extracción (expresado en segundos, indicando el tiempo que se aplica los ultrasonidos por segundo). Como ejemplo, en esta última variable, un ciclo de 0.5 segundos indica una extracción en la cual durante cada segundo, la mitad de tiempo se está aplicando ultrasonidos y la otra mitad del tiempo no.

El procedimiento de extracción mediante UAE se ha realizado de la siguiente manera:

En un “falcon” de 50 ml se pesa exactamente una cantidad de muestra de jaboticaba (en torno a 1.5 gramos) y se añade el volumen de disolvente que para cada extracción sea necesario. Acto seguido, se introduce el “falcon” en el vaso de doble pared, en el que se ha adicionado agua en su interior. Esta

agua está a la temperatura indicada para cada extracción (controlada con un termómetro). La temperatura se programa en el controlador de temperatura del baño termostático. Hay que tener en cuenta de que la sonda de extracción no toque la base del “falcon”. Tras esto, se procede a la extracción en las condiciones indicadas en cada caso, durante el tiempo que se haya estimado.

Una vez finalizada la extracción, si se hubiese realizado a altas temperaturas, se procede al atemperamiento de la muestra. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se filtra el extracto mediante papel de filtro (filtro cónico). En cada caso, el “falcon” se lava con 5 mL del mismo disolvente con el que se haya realizado la extracción. El extracto filtrado se recoge en un matraz aforado de 25 mL que se enrasa con el mismo disolvente empleado anteriormente.

Una vez enrasado el extracto a 25 mL y habiendo sido homogeneizada, se toma una pequeña porción con una jeringuilla de plástico y se filtra con un filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  (MS Nylon Syringe, Membrane Solutions, Dallas, EE. UU.), obteniéndose el filtrado en un vial de HPLC perfectamente etiquetado, el cual será pinchado mediante UHPLC-UV-Vis.

El resto del extracto se almacena a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

## **5.4. Extracción mediante fluidos presurizados PLE**

### **5.4.1. Equipo de extracción**

Para las extracciones mediante fluidos presurizados se ha empleado un sistema de extracción ASE 200 (“Accelerated Solvent Extractor”, Dionex, Sunnyvale, California, EEUU). Este equipo consta de varios componentes:

- Un panel de control para indicar las condiciones de extracción y el funcionamiento del equipo, a través de software que permite seleccionar las distintas variables.
- Dos carruseles giratorios, uno de ellos para la colocación de las cámaras de extracción (11 mL de capacidad, acero inoxidable de alta resistencia), y el otro para la colocación de los viales recolectores de los extractos, así como un vial recolector de residuos.
- Un compartimento, donde se encuentran los indicadores de presión de disolvente, descompresión del horno y del sistema de  $\text{N}_2$ .

- Una zona donde se encuentra el horno y el brazo automático que recoge la cámara de extracción, la deposita en el horno y luego, la regresa al carrusel giratorio cuando ha finalizado la extracción.
- Un mecanismo de aguja que accede al vial de recolección, permitiendo recoger los extractos.



*Figura 3. Equipo de extracción mediante fluidos presurizados*

#### **5.4.2. Procedimiento de extracción**

Las variables de extracción que se han estudiado con este método han sido: Porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, presión de extracción, volumen de lavado (en % con respecto al volumen total de la cámara (11 mL), que lavará la cámara tras realizar la extracción) y tiempo de purga (tiempo en el que está pasando una corriente de  $N_2$  tras el lavado de la cámara para arrastrar y recoger el disolvente que haya quedado en la cámara de extracción).

El procedimiento de extracción mediante PLE se ha realizado de la siguiente manera:

En primer lugar debe de prepararse la cámara de extracción. La cámara consta de un cilindro central y dos tapas enroscables en el cilindro, una superior y otra inferior. Se enrosca la tapa inferior de la cámara y seguidamente, en la parte inferior del cilindro se coloca un filtro de celulosa. A continuación se añade arena de mar de grano grueso (Panreax, Barcelona, España) hasta aproximadamente la mitad del cilindro. Posteriormente se adiciona una cantidad exacta de muestra pesada de jaboticaba (en torno a 1.5 gramos). Tras esto, se rellena el resto de la cámara con arena de mar de grano grueso y se enrosca la tapa superior de la cámara, con cuidado de que no quede parte de la arena en la rosca.

Una vez la cámara esté preparada, se procede a la extracción. Para ello, la cámara se coloca en el carrusel giratorio superior (teniendo cuidado de que el filtro quede en la parte inferior). Se selecciona en el panel de control del equipo las condiciones con las que se va a llevar a cabo la extracción y se inicia la extracción. El equipo realiza a partir de aquí la extracción de forma automática, siguiendo los siguientes pasos:

- Llenado de la cámara de extracción con el disolvente de extracción, hasta alcanzar la presión deseada.
- Transcurre un tiempo de precalentamiento de la cámara que es más o menos largo en función de la temperatura a la que se vaya a realizar la extracción.
- Transcurre un tiempo de extracción, el cual habrá sido predeterminado previamente en el que se produce la extracción a la temperatura y presión programada.
- Tras realizarse la extracción se procede al lavado de la cámara. La válvula inferior, hasta este momento cerrada, se abre, y pasa un volumen de disolvente de extracción en función del volumen de la cámara según se haya programado. El extracto se recoge en un vial situado en el carrusel inferior.
- Pasa  $N_2$  gas que arrastra el disolvente de lavado que haya podido quedar en la cámara de extracción. El líquido que arrastra el  $N_2$  se recoge en el mismo vial situado en el carrusel inferior.

Una vez recogido el extracto, éste se vierte en un matraz aforado de 25 mL y se enjuaga el vial con 5 mL del disolvente utilizado en la extracción. Una vez enrasado el extracto a 25 mL y habiendo sido homogeneizada, se toma una pequeña porción con una jeringuilla de plástico y se filtra con un filtro de nylon de 0.22  $\mu m$  (MS Nylon Syringe, Membrane Solutions, Dallas, EE. UU.), obteniéndose el filtrado en un vial de HPLC perfectamente etiquetado, el cual será pinchado mediante UHPLC-UV-Vis.

El resto del extracto se almacena a  $-20\text{ }^{\circ}C$  para su posterior análisis de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

## **5.5. Espectroscopia UV-Vis**

### **5.5.1. Equipo UV-Vis**

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se ha empleado un espectrofotómetro Jasco V-530 (JASCO Corporation, Tokyo, Japón). Este equipo dispone de una fuente de luz halógena de tungsteno y deuterio y un fotodetector de doble haz. Presenta un ancho de banda de 2 nm, y su rango de longitud de onda va desde 190 a 1100 nm, con una velocidad de escaneo de hasta 4000 nm/min.



*Figura 4. Espectrofotómetro UV-Vis*

#### **5.5.2. Procedimiento de Folin-Ciocalteu**

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realiza mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu. Este procedimiento está basado en la reactividad que presentan los compuestos fenólicos presentes en las muestras al interaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico. Éste forma un complejo de coloración azul que puede ser medido a 750 nm. Dicho color va a ser directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto. En consecuencia, los compuestos fenólicos presentes en la jaboticaba se oxidan al interaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, formando un complejo de coloración azul.

Para llevar a cabo este método se han seguido los siguientes pasos:

- En un matraz aforado de 25 mL, se añaden 250  $\mu$ L del extracto, que anteriormente se ha filtrado con filtros de jeringa de nylon de 0.45  $\mu$ m (MS Nylon Syringe Filter, Membrane Solutions, Dallas, EE.UU.).
- Se adicionan 12.5 mL de agua destilada.
- Posteriormente, se adiciona 1.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu.
- A continuación se adicionan 5 mL de una disolución de carbonato sódico al 20%.
- Por último, el matraz aforado de 25 mL se enrasa con agua destilada, homogeneizando posteriormente el mismo.

- Una vez agitado el matraz, se esperan 30 minutos para la medición de la absorbancia. Este tiempo de espera asegura la formación del complejo azul. Pasado este tiempo, se procederá al análisis UV-Vis a una longitud de onda de 750 nm. Debido a la inestabilidad del compuesto formado, todos los extractos son medidos minuciosamente a los 30 minutos.



*Figura 5. Muestras realizadas mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu.*

Previamente a la medición de los extractos, se ha realizado una recta de calibración en las mismas condiciones a las que se analizaron los extractos para poder llevar a cabo la cuantificación de los compuestos fenólicos totales. Esta recta se ha realizado con la sustancia patrón típica empleada para este método, el ácido gálico. Para ello, se han realizado disoluciones de distinta concentración de ácido gálico (1 – 1000 ppm), obteniéndose una correlación a partir de la cual se puede referenciar la concentración de los compuestos fenólicos totales presentes en la jaboticaba a una concentración equivalente del ácido gálico en ppm.

La recta de calibrado obtenida a partir del ácido gálico fue la siguiente:  $y = 0.0011x + 0.0003$ . Los parámetros analíticos de dicha recta son:  $r^2 = 0.9999$ , **Límite de detección (LOD) = 2.42 ppm**; **Límite de Cuantificación (LOQ) = 8.07 ppm**.

### **5.6. Identificación de antocianinas mediante UHPLC-Q-ToF-MS**

La identificación de las antocianinas se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a un espectrómetro de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS) (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). La columna que ha sido empleada para la

separación cromatográfica es de fase reversa tipo C-18 (Acquity UPLC BEH C18, Waters; 2.1 mm x 100 mm, tamaño de partícula 1.7  $\mu$ m). El volumen de inyección empleado ha sido de a 3  $\mu$ L.



*Figura 6. Espectrómetro de masas UHPLC-Q-ToF-MS empleado.*

Los disolventes empleados como fase móvil han sido: Agua acidificada (2% de ácido fórmico) como disolvente A y metanol como disolvente B. La velocidad de flujo empleada ha sido de 0.4 mL/min. El gradiente utilizado se recoge en la Tabla 1.

Tiempo (min)	% disolvente B
0	15
3.30	20
3.86	30
5.05	40
5.35	55
5.64	60
5.95	95
7.50	95

*Tabla 1. Gradiente empleado para la identificación de antocianinas mediante UHPLC-Q-ToF-MS.*

El tiempo total de análisis para la identificación de antocianos fue de 12 minutos, incluyendo 4 minutos de pre-equilibrado de la columna.

Para la medición de las antocianinas presentes en los extractos de jaboticaba se ha empleado un modo de ionización positiva por electrospray. Los parámetros de ionización empleados en el método han sido los siguientes:

- Flujo de gas de solvatación: 700 L/h
- Temperatura de solvatación: 500 °C
- Flujo de gas del cono: 10 L/h
- Temperatura de la fuente: 150 °C
- Tensión del capilar: 700 V
- Voltaje del cono: 30 V
- Energía de colisión: 2 eV
- Modo de barrido (m/z): 100-1200 u.m.a.

Las antocianinas identificadas en la jaboticaba han sido: cianidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido (Anexo I). Las m/z ( $M^+$ ) obtenidas para estas dos antocianinas presentes en la jaboticaba han sido 449 y 465 respectivamente.

### **5.7. Cuantificación de antocianinas mediante UHPLC-UV-Vis.**

La cuantificación de las antocianinas presentes en los extractos de jaboticaba se ha realizado mediante el empleo de la cromatografía líquida de ultra eficacia con detección ultravioleta-visible (UHPLC-UV-Vis). El equipo empleado (Figura 7) ha sido un cromatógrafo de líquidos Elite HPLC LaChrom Ultra System (VWR Hitachi, Tokyo, Japón), compuesto por los siguientes componentes:

- Automuestrador L-2200U
- Horno de columna L-2300
- 2 bombas L-2160
- Detector UV-Vis L-2420U
- Columna Halo TMC18 Hitachi LaChrom (100 x 3 mm, tamaño de partícula 2.7  $\mu$ m)

Las antocianinas han sido cuantificadas a una longitud de onda de 520 nm. La temperatura del horno de columna se ha fijado en 50 °C y el volumen de inyección empleado ha sido de 15  $\mu$ L.





*Figura 7. Equipo de UHPLC-UV-Vis empleado.*

Los disolventes empleados como fase móvil han sido: Agua acidificada (5% de ácido fórmico) como disolvente A y metanol como disolvente B. La velocidad de flujo empleada ha sido de 1.0 mL/min. El gradiente utilizado se recoge en la Tabla 2.

Tiempo (min)	% Disolvente B
0	15
1.50	20
3.30	30
4.80	40
5.50	55
5.90	60
6.60	95
9.30	95
10.0	15

*Tabla 2. Gradiente empleado para la separación de antocianinas mediante UHPLC-UV-Vis*

La cuantificación de las antocianinas presentes en la jaboticaba se ha realizado empleando como referencia la recta de calibrado del patrón de cloruro de pelargonidina. A partir de esta recta de calibrado, se han elaborado sendas rectas de calibrado para la cianidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido respectivamente, habiendo tenido en cuenta los pesos moleculares de estas dos antocianinas. Todos los datos se exponen en la Tabla 3.

Compuesto	Recta de calibrado	R <sup>2</sup>	LOD	LOQ
Cloruro de pelargonidina	300568.88x – 28462.43	0.9999	0.198	0.662
Cianidina-3-O-glucósido	181419.52x – 28462.43	0.9999	0.291	0.970
Delfinidina-3-O-glucósido	175182.22x – 28462.43	0.9999	0.301	1.004

Tabla 3. Rectas de calibrado correspondiente a las antocianinas presentes en la jaboticaba y sus parámetros.

El cromatograma característico para la separación de las antocianinas presentes en la jaboticaba empleando la cromatografía líquida de ultra resolución con detección UV-Vis a 520 nm en el equipo utilizado se recoge en la Figura 8.

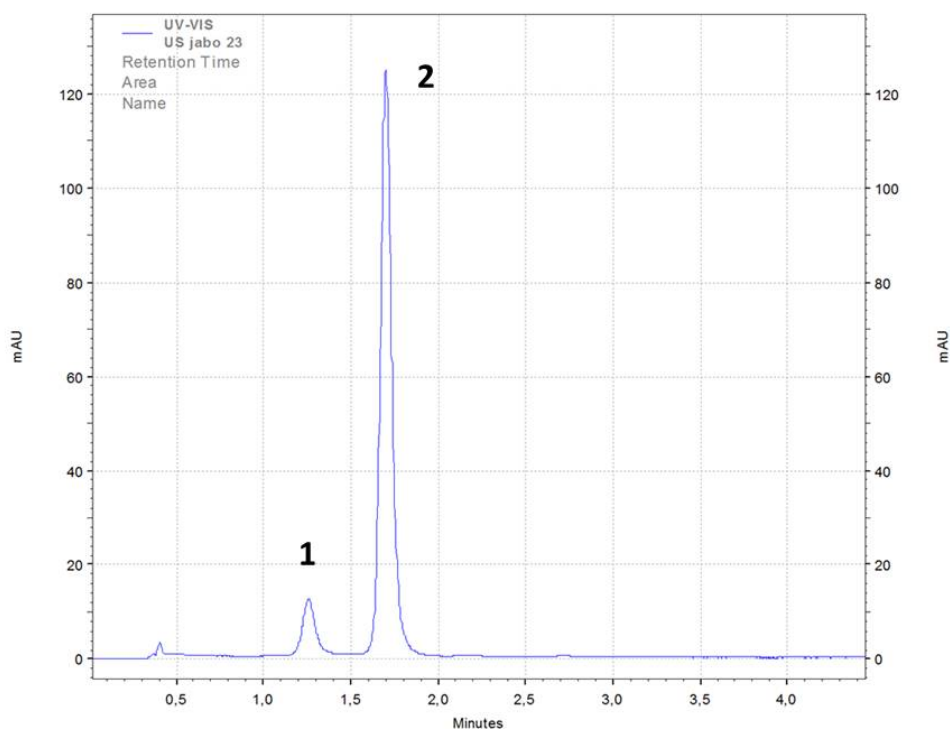


Figura 8. Cromatograma característico para las antocianinas en la jaboticaba. 1- Delfinidina-3-O-glucósido; 2- Cianidina-3-O-glucósido.

A la vista de la figura 8 se observa que se produce una correcta separación de las dos antocianinas mayoritarias presentes en la jaboticaba, en un tiempo muy pequeño, inferior a dos minutos (1.24 minutos para la delfinidina-3-O-glucósido y 1.71 minutos para la cianidina-3-O-glucósido).

### 5.8.1 Diseño de experimentos Box-Behnken (BBD)

Un diseño de experimento es una metodología matemática y estadística que permite una planificación de la secuencias de experimentos a realizar de forma óptima, minimizándose tanto el coste de la experimentación como la influencia del error experimental.<sup>50</sup>

El diseño de experimentos de Box-Behnken (BBD) es un tipo de diseño de superficie de respuesta dónde cada variable independiente recibe uno de los tres posibles valores tomados. Dichos valores son codificados como -1, 0 y 1. Este modelo presenta una gran ventaja ya que evita la realización de experimentos en condiciones extremas.

Dicho diseño debe adaptarse a un modelo cuadrático y debe existir un número de puntos experimentales razonables en comparación con el número de variables. La varianza de estimación debe depender sólo de la distancia desde el centro y no debe variar demasiado en el interior del cubo más pequeño que contiene los puntos experimentales.

En nuestro estudio, el diseño de experimento de Box-Behnken (BBD) se emplea para obtener los parámetros más significativos del sistema de extracción empleado, así como las condiciones óptimas de extracción para cada sistema de extracción estudiado.

Para este diseño se han definido en cada metodología de extracción 6 variables independientes, y dos variables dependientes o respuestas del método (antocianinas totales y compuestos fenólicos totales). Para cada una de estas variables dependientes se ha llevado a cabo un diseño de experimentos independiente obteniendo en cada caso las condiciones óptimas de extracción. Los 54 ensayos realizados con cada metodología de extracción han sido empleados para la elaboración del diseño de Box-Behnken tanto para antocianinas totales como para compuestos fenólicos totales.

La representación gráfica (Figura 9) de un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken consiste en un cubo dónde el punto central se encuentra en el interior del mismo mientras que los puntos medios se encuentran en los bordes. Este diseño es el empleado para la optimización de las condiciones de extracción de antocianinas y compuestos fenólicos totales en los dos tipos de técnicas de extracción llevadas a cabo.

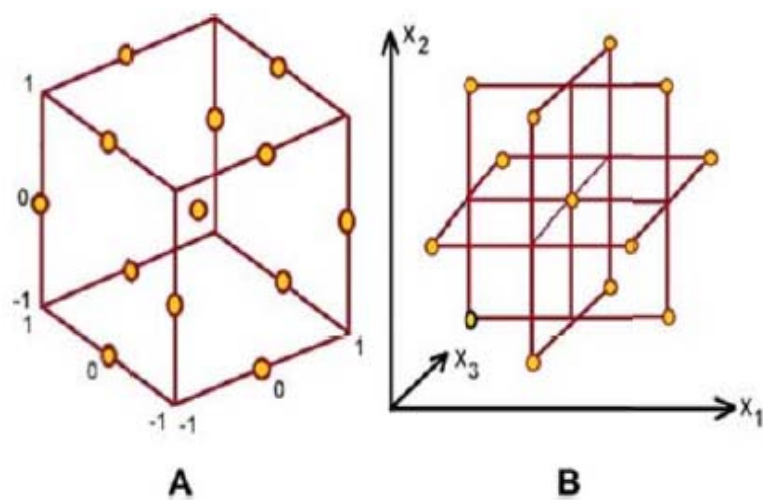


Figura 9. Representación gráfica del modelo de Box-Behnken.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (UAE)

#### 6.1.1 Optimización mediante diseño de experimentos Box-Behnken.

Para hallar los parámetros óptimos de extracción de antocianinas totales y de compuestos fenólicos totales mediante el empleo de la UAE se ha empleado un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken. En dicho diseño de experimentos se han estudiado 6 variables de extracción (variables independientes), las cuales han sido: Porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, relación masa de muestra : volumen de disolvente, amplitud de ultrasonidos (en % con respecto a la potencia máxima de la sonda (200W)) y ciclo de extracción (expresado en segundos, indicando el tiempo que se aplica los ultrasonidos por segundo).

Como variables dependientes se han empleado las respuestas obtenidas, por un lado la cantidad de antocianinas totales extraídas, como suma de la concentración de cianidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido (diseño de experimentos 1) y por otro lado la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos (diseño de experimentos 2). La tabla del diseño de experimentos empleados se recoge en el Anexo II.

Los rangos de las variables empleadas se recogen en la Tabla 4. La cantidad de muestra tomada para las extracciones fue aproximadamente de 1.5 gramos empleando un tiempo de extracción de 10 minutos. Para este diseño se emplearon 54 ensayos según se recoge en el Anexo II. Cada ensayo fue llevado a cabo por duplicado.

PARÁMETRO	RANGOS
% MeOH	25 – 50 – 75
Temperatura °C	10 – 40 – 70
Amplitud %	30 – 50 – 70
Ciclo	2 – 4.5 – 7
pH	3 – 5 – 7
Volumen (mL)	10 – 15 – 20

*Tabla 4. Variables de extracción y rangos considerados para la extracción UAE.*

### 6.1.2. Condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de los compuestos fenólicos totales se analizaron los 54 extractos por duplicado obtenidos tras realizar todas las extracciones. Los 108 extractos fueron analizados mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu para determinar su concentración en compuestos fenólicos totales.

Los valores medios obtenidos de compuestos fenólicos totales se introdujeron en un diseño de experimentos de Box-Behnken de 6 variables mediante el programa Statgraphic (versión Centurion XVII), utilizando, como se ha dicho previamente, como respuesta o variable dependiente la concentración de compuestos fenólicos totales. Resultado del tratamiento estadístico de los datos, el programa aporta las variables que más influyen en la extracción de compuestos fenólicos totales (Figura 10), así como las condiciones óptimas de extracción en las condiciones que se han estudiado (Tabla 5).

Los resultados de dicho tratamiento estadístico vienen recogidos en el diagrama de Pareto, (Figura 10).

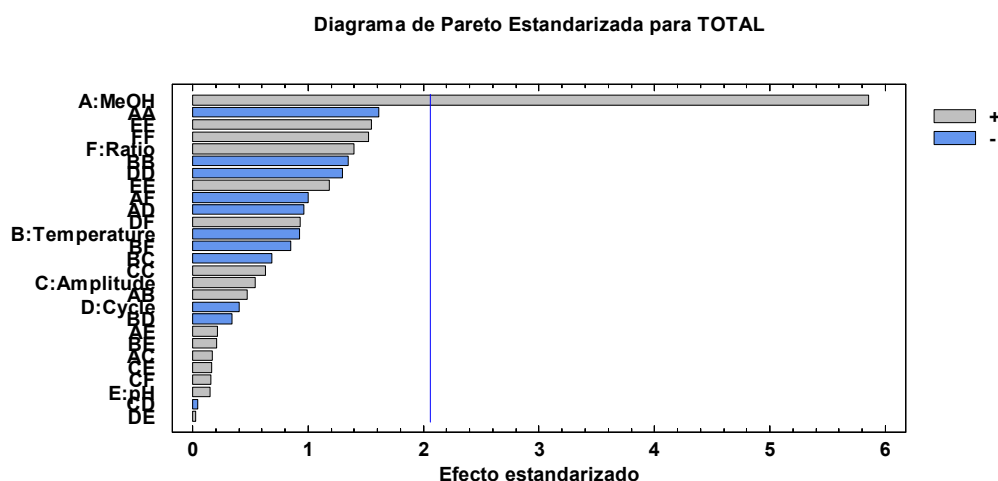


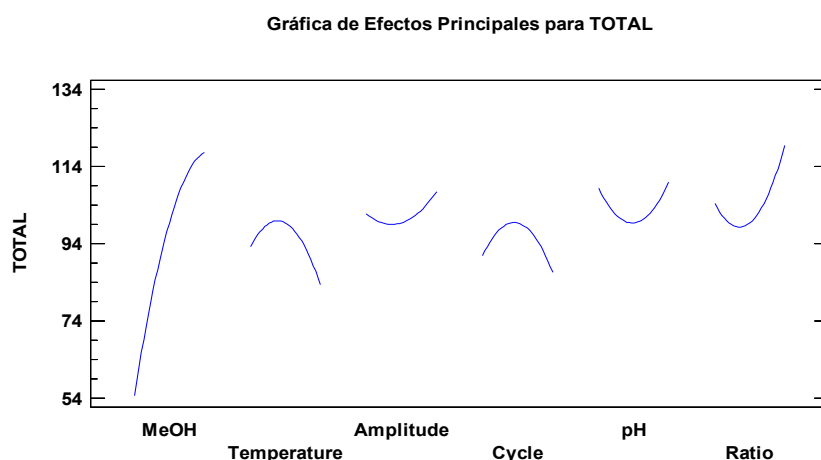
Figura 10. Diagrama de Pareto obtenido para la respuesta “compuestos fenólicos totales”.

A la vista de la Figura 10, se observa que el parámetro que más influye a la hora de extraer los compuestos fenólicos totales en la jaboticaba es el porcentaje de MeOH empleado en el disolvente de extracción. A la vista de este diagrama, se observa que el resto de variables parece que no influyen significativamente a la hora de extraer estos compuestos mediante esta técnica. Las condiciones óptimas obtenidas a partir del diseño se recogen en la Tabla 5.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
% MeOH	72.10
Temperatura (°C)	26
Amplitud (%)	68.54
Ciclo (s)	0.5
pH	7
Volumen (mL)	20

*Tabla 5. Valores óptimos de extracción de compuestos fenólicos mediante UAE.*

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que para extraer los compuestos fenólicos totales en la jaboticaba se requiere un porcentaje de 72.10% de metanol en el disolvente de extracción. El resto de variables no son tan influyentes, aunque presenten un valor óptimo para cada una de ellas. Dicha afirmación se visualiza en la Figura 11 donde se muestra el efecto de todas las variables empleadas sobre la extracción mediante UAE.

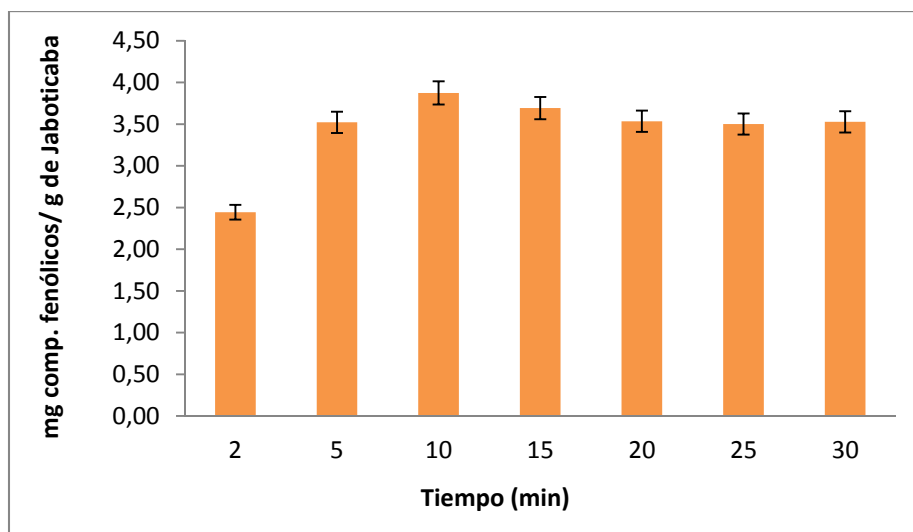


*Figura 11. Gráfico de efectos principales de las variables consideradas en la UAE.*

#### 6.1.2.1. Tiempo de extracción

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción, se realizó un estudio para determinar el tiempo óptimo de extracción trabajando en las condiciones óptimas obtenidas. Para ello se realizaron extracciones por duplicado en las condiciones óptimas, pero en distintos tiempos de extracción: 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Los extractos obtenidos a diferentes tiempos se analizaron nuevamente mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 12 donde se representan los miligramos de compuestos fenólicos totales extraídos por gramo de jaboticaba, en función del tiempo de extracción.



*Figura 12. Compuestos fenólicos totales extraídos en función del tiempo de extracción.*

A partir de los resultados obtenidos se observa que hay un incremento en la cantidad de compuestos fenólicos totales hasta el minuto 10 de extracción. A partir de este tiempo se observa una pequeña disminución en la cantidad total de compuestos fenólicos extraídos, aunque dicha disminución no es estadísticamente significativa. Por tanto, se obtiene que 10 minutos de extracción es la tiempo óptimo de extracción de compuestos fenólicos totales en la jaboticaba.

#### **6.1.2.2. Repetitividad y reproducibilidad del método**

Una vez obtenidas todas las condiciones óptimas de extracción, se realizó un estudio de la repetitividad y reproducibilidad del método desarrollado para los compuestos fenólicos totales en jaboticaba. Para ellos se realizaron distintas extracciones en las condiciones óptimas. Para la repetitividad se realizaron 12 extracciones en un mismo día y para el estudio de reproducibilidad se hicieron 9 extracciones adicionales cada día en otros dos días diferentes (30 extracciones en total). Los resultados se recogen en la Tabla 6.



PARÁMETRO	REPETITIVIDAD	REPRODUCIBILIDAD
Media (mg fenólicos Tot. / g Jaboticaba)	3.61	3.52
Desviación estándar	0.11	0.12
Desviación estándar relativa (%)	3.17	3.60

Tabla 6. Parámetros estadísticos del estudio de repetitividad y reproducibilidad.

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta una repetitividad y reproducibilidad óptimas ( $DER < 5\%$ ).

### 6.1.3. Condiciones óptimas de extracción para antocianinas

Para determinar las condiciones óptimas de extracción para antocianinas totales, tal como ocurría con los compuestos fenólicos totales, se emplearon las 54 extracciones por duplicado utilizadas para el diseño de experimentos anterior. En este caso como variable dependiente se empleó la cantidad de antocianinas totales presentes en los extractos. Los 108 extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra eficacia (UHPLC) dando como resultados la cuantificación de las 2 antocianinas presentes mayoritariamente en la jaboticaba. Con los valores de concentración obtenidos para cada una de ellas, se hizo un sumatorio de ambos obteniendo de esta manera la concentración total de antocianinas. Estos valores totales fueron los empleados en el tratamiento estadístico de Box-Behnken mediante el programa Statgraphic (versión Centurion XVII), de forma similar a los compuestos fenólicos totales. De esta forma se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción y se hallaron los parámetros de extracción más influyentes a la hora de extraer las antocianinas totales en las jaboticabas (Figura 13).

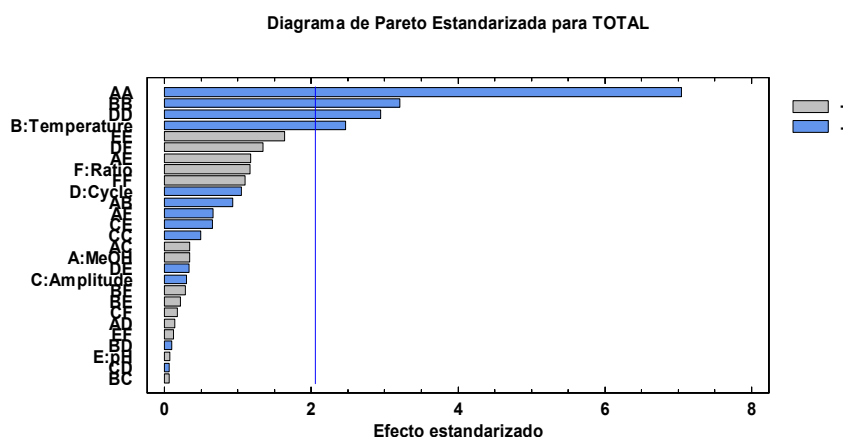
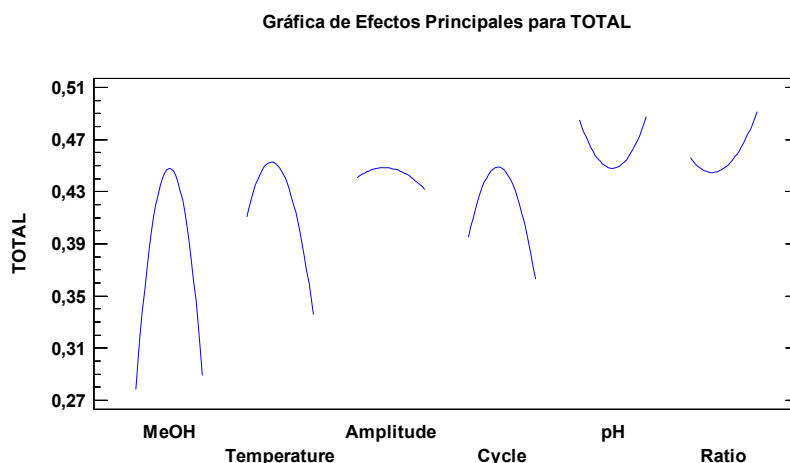


Figura 13. Diagrama de Pareto para antocianinas totales mediante UAE.

A la vista de la figura 13, se observa que los parámetros que más influyen a la hora de extraer las antocianinas totales en la jaboticaba son el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción (efecto cuadrático), así como el efecto cuadrático de la temperatura, del ciclo y el lineal de la temperatura. El resto de variables no representan un efecto significativo en la extracción. Se observa por tanto que de nuevo es el porcentaje de metanol el parámetro más influyente a la hora de extraer las antocianinas totales, teniendo además para este tipo de compuestos una relevancia significativa la temperatura de extracción y el ciclo de extracción.

Este efecto se observa aún más claramente en la Figura 14, donde se representa el gráfico de efectos principales para el diseño realizado. En esta figura se observa claramente la influencia de estas tres variables a la hora de extraer las antocianinas totales.



*Figura 14. Gráfico de efectos principales de las variables empleadas en la extracción de antocianinas.*

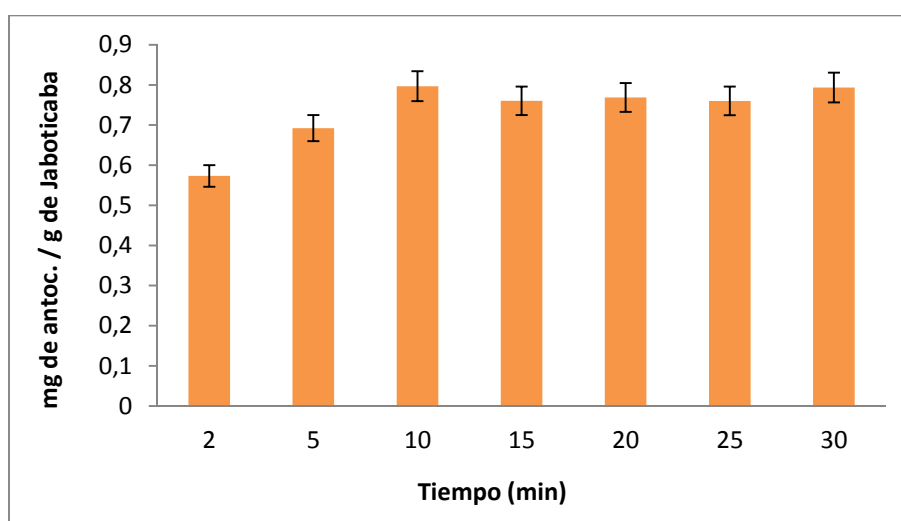
Los valores óptimos de extracción obtenidos tras el diseño de experimentos se exponen en la Tabla 7. Se observa que el valor óptimo de porcentaje metanol en el disolvente de extracción está en torno al 50%, valor característico para la extracción de antocianinas empleando la extracción mediante fluidos presurizados. Como temperatura óptima de extracción se ha obtenido 39.81 °C, temperatura intermedia, que evita la degradación de las antocianinas a temperaturas mayores (compuestos bastante inestables) y cinéticas de extracción lentas a temperaturas menores.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
% MeOH	51.36
Temperatura (°C)	39.81
Amplitud (%)	34
Ciclo (s)	0.47
pH	7
Volumen (mL)	20

*Tabla 7. Condiciones óptimas de extracción para las antocianinas totales mediante UAE.*

### 6.1.3.1 Tiempo de extracción

Tras la obtención de las condiciones óptimas de extracción se procedió a determinar el tiempo óptimo de extracción de antocianinas totales en dichas condiciones. Para ellos se realizaron distintas extracciones por duplicado en tiempos de extracción diferentes: 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. La cantidad de antocianinas totales extraídas en función del tiempo se representa en la Figura 15.



*Figura 15. Antocianinas totales extraídas en función del tiempo de extracción mediante UAE.*

De igual manera que ocurría en la extracción de compuestos fenólicos totales, se observa que la extracción máxima de antocianinas se produce a un tiempo de 10 minutos. A partir de este momento se observa una cierta disminución en la cantidad total de antocianinas, debido seguramente a la degradación de estos compuestos. Por tanto, se obtiene de nuevo, que el tiempo óptimo de extracción de estos compuestos es de 10 minutos.

### 6.1.3.2. Repetitividad y reproducibilidad del método

Se ha realizado un estudio de repetitividad y reproducibilidad del método desarrollado para las antocianinas totales presentes en la jaboticaba. La forma de ejecución ha sido tal cual se realizó para los compuestos fenólicos totales. Se realizaron distintas extracciones en las condiciones óptimas, 12 extracciones consecutivas en un mismo día para la repetitividad y para el estudio de la reproducibilidad se hicieron 9 extracciones por día en otros dos días distintos (30 extracciones en total). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8.

PARÁMETRO	REPETITIVIDAD	REPRODUCIBILIDAD
Media (mg ant / g Jaboticaba)	0.751	0.784
Desviación estándar	0.032	0.037
Desviación estándar relativa (%)	4.31	4.68

*Tabla 8. Parámetros estadísticos del estudio de repetitividad y reproducibilidad.*

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta una repetitividad y reproducibilidad óptimas ( $DER < 5\%$ ).

## 6.2. EXTRACCIÓN MEDIANTE FLUIDOS PRESURIZADOS (PLE)

### 6.2.1. Optimización mediante diseños de experimentos

Para hallar los parámetros óptimos de extracción de antocianinas totales y de compuestos fenólicos totales mediante el empleo de la extracción mediante fluidos presurizados, se ha empleado nuevamente un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken. En dicho diseño de experimentos se han estudiado de nuevo 6 variables de extracción (variables independientes), las cuales han sido: Porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, pH del disolvente, temperatura de extracción, presión de extracción, volumen de lavado (en % con respecto al volumen total de la cámara (11 mL), que lavará la cámara tras realizar la extracción) y tiempo de purga (tiempo en el que está pasando una corriente de  $N_2$  tras el lavado de la cámara para arrastrar y recoger el disolvente que haya quedado en la cámara de extracción).

De igual manera a como se realizó con UAE, como variables dependientes se han empleado las respuestas obtenidas, por un lado, la cantidad de antocianinas totales extraídas, como suma de la concentración de cianidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido (diseño de experimentos 1) y por otro lado la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos (diseño de experimentos 2). La tabla del diseño de experimentos empleados se recoge en el Anexo II.

Los rangos de las variables empleadas se recogen en la Tabla 9. La cantidad de muestra tomada para las extracciones fue nuevamente de 1.5 gramos empleando un tiempo de extracción de 10 minutos. Para este diseño se emplearon 54 ensayos según se recoge en el Anexo II. Cada ensayo fue llevado a cabo por duplicado.

PARÁMETRO	RANGOS
% MeOH	25 – 50 – 75
Temperatura (°C)	50 – 75 – 100
Presión (atm)	100 – 150 – 200
Tiempo de purga (s)	30 – 60 – 90
pH	3 – 5 – 7
% Volumen de lavado	50 – 75 – 100

*Tabla 9. Rangos de las variables empleadas en el diseño de experimentos mediante PLE.*

### **6.2.2. Condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales**

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos totales mediante fluidos presurizados se realizó el diseño de experimento tal como se ha comentado en el punto 6.2.1. Para ello se realizaron 54 extracciones del diseño, por duplicado, modificando las variables en los parámetros indicados en la Tabla 9. Los extractos obtenidos se analizaron mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu para obtener la concentración total de compuestos fenólicos en cada extracto. Los valores obtenidos (media de cada una de las 54 extracciones) se introdujeron en un diseño estadístico de tipo Box- Behnken mediante el programa Statgraphic (versión Centurion XVII) con el propósito de obtener las condiciones óptimas de extracción y los parámetros más influyentes en ella. Los resultados se recogen en el diagrama de Pareto para dicho diseño (Figura 16) y el gráfico de efectos principales (Figura 17).

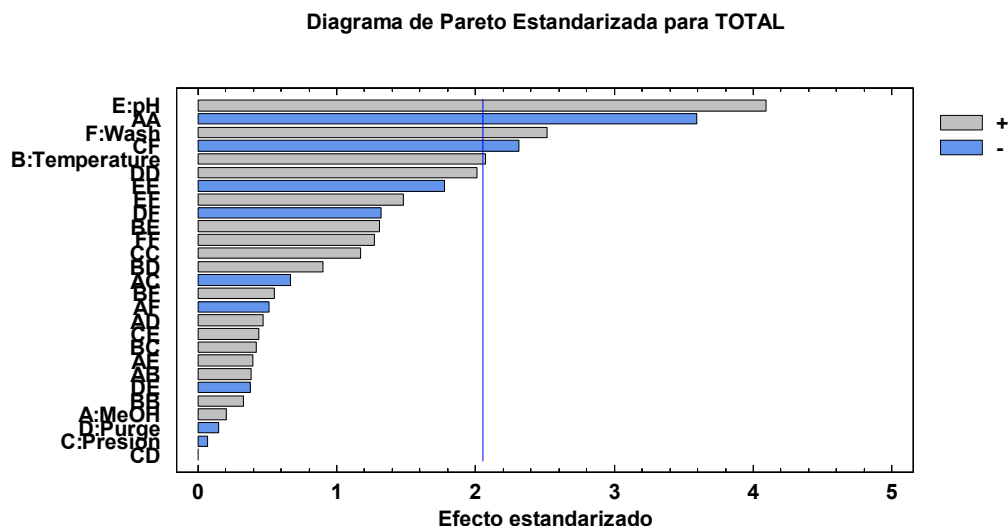


Figura 16. Diagrama de Pareto para la concentración de compuestos fenólicos totales.

Del diagrama de Pareto se puede concluir que los factores que más influyen a la hora de extraer los compuestos fenólicos totales en la jaboticaba al emplear la extracción mediante fluidos presurizados son el pH del disolvente de extracción, así como el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción (efecto cuadrático). Otros parámetros que tienen una influencia estadísticamente significativa a la hora de extraer estos compuestos son el volumen de lavado de la cámara, el efecto de la presión y el lavado, así como la temperatura de extracción.

Una visualización más gráfica de lo comentado anteriormente se muestra en el gráfico de efectos principales (Figura 17).

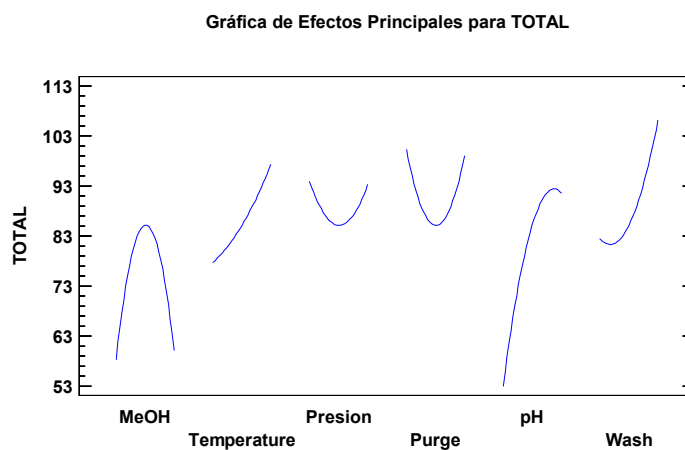


Figura 17. Gráfico de efectos principales de las variables en la respuesta “compuestos fenólicos totales”.

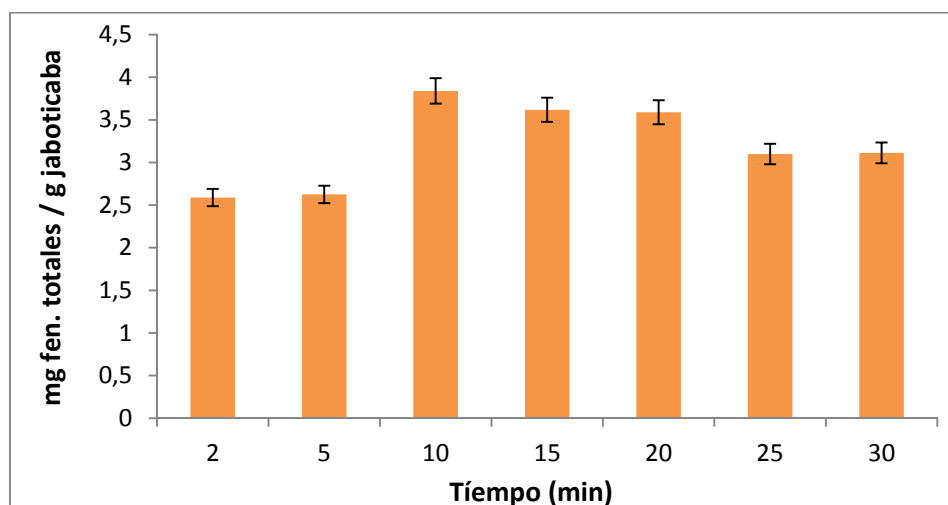
En dicho gráfico se verifica lo comentado anteriormente, siendo la variable más influyente el pH, junto con el porcentaje de metanol. Las condiciones óptimas para las extracciones tras el diseño de experimentos se recogen en la Tabla 10.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
% MeOH	48.25
Temperatura (°C)	99
Presión (atm)	199
Tiempo de purga (s)	30
pH	7
% Volumen de lavado	100

*Tabla 10. Condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales.*

#### 6.2.2.1 Tiempo de extracción

Nuevamente, tras obtener las condiciones óptimas de extracción, se procedió a determinar el tiempo óptimo de extracción bajo estas condiciones. Para ello se realizaron por duplicado diversas extracciones a distintos tiempos de extracción: 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Los extractos fueron analizados mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18 donde se representan los miligramos de compuestos fenólicos totales obtenidos por gramo de jaboticaba en función del tiempo de extracción.



*Figura 18. Compuestos fenólicos totales extraídos en función del tiempo de extracción mediante PLE.*

Tras la representación gráfica, se observa que la máxima cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos se produce a un tiempo de 10 minutos. Tiempos inferiores no son suficientes para realizar una extracción cuantitativa, mientras que a tiempos mayores se observa una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de compuestos fenólicos extraídos, seguramente por degradación de los mismos.

#### 6.2.2.2. Repetitividad y reproducibilidad del método

Una vez obtenidos los parámetros óptimos de extracción se ha realizado un estudio de repetitividad y reproducibilidad del método desarrollado para compuestos fenólicos totales presentes en la jaboticaba. La forma de ejecución ha sido tal cual se realizó para la extracción asistida por ultrasonidos. Se realizaron distintas extracciones en las condiciones óptimas, 12 extracciones consecutivas en un mismo día para la repetitividad, y para el estudio de la reproducibilidad se hicieron 9 extracciones por día, en otros dos días distintos (30 extracciones en total). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 11.

PARÁMETRO	REPETITIVIDAD	REPRODUCIBILIDAD
Media (mg Fenólicos Tot. / g Jaboticaba)	3.84	3.80
Desviación estándar	0.14	0.15
Desviación estándar relativa (%)	3.69	3.90

*Tabla 11. Parámetros estadísticos del estudio de repetitividad y reproducibilidad.*

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta una repetitividad y reproducibilidad óptimas ( $DER < 5\%$ ).

#### 6.2.3 Condiciones óptimas de extracción para antocianinas totales

Como se realizó con UAE, se han empleado los mismos 54 ensayos realizados inicialmente para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de antocianinas mediante PLE. Los 108 extractos fueron analizados mediante UHPLC-UV-Vis para obtener la cantidad de antocianinas extraídas en la jaboticaba (suma de cianidina-3-O-glucósido y delfinidina-3-O-glucósido). A estos valores totales se le aplicaron el tratamiento estadístico de Box-Behnken mediante el programa



Statgraphic (versión Centurion XVII), de forma similar a los compuestos fenólicos, obteniéndose las condiciones óptimas de extracción junto con los parámetros de extracción más influyentes.

Se observa en el diagrama de Pareto (Figura 19) obtenido mediante este diseño de experimento, que a la hora de extraer las antocianinas totales mediante PLE, los factores que más influyen en la extracción son el pH del disolvente de extracción (efecto lineal y cuadrático) y el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción. Estos parámetros son prácticamente los mismos que se obtenían para compuestos fenólicos totales.

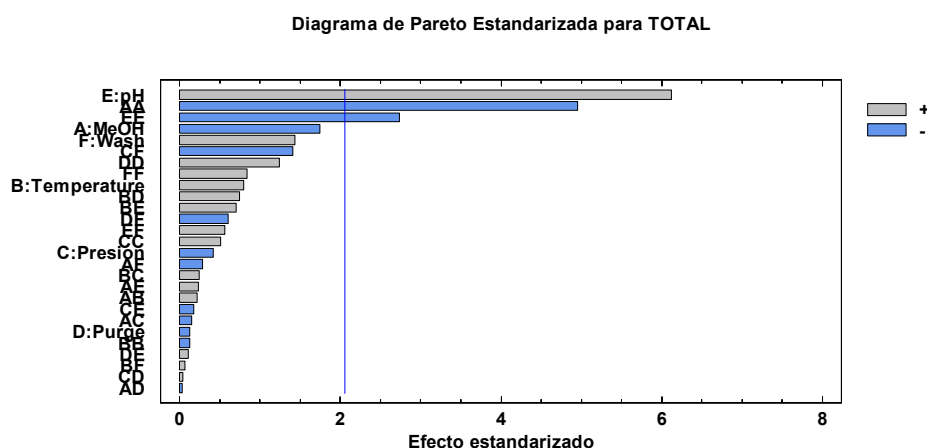


Figura 19. Diagrama de Pareto para la respuesta antocianinas totales.

Para una visualización más gráfica de lo comentado anteriormente se muestra a continuación el gráfico de efectos principales totales (Figura 20) para este diseño de experimentos. Se observa de nuevo como las variables pH y porcentaje de metanol son los factores más influyentes.

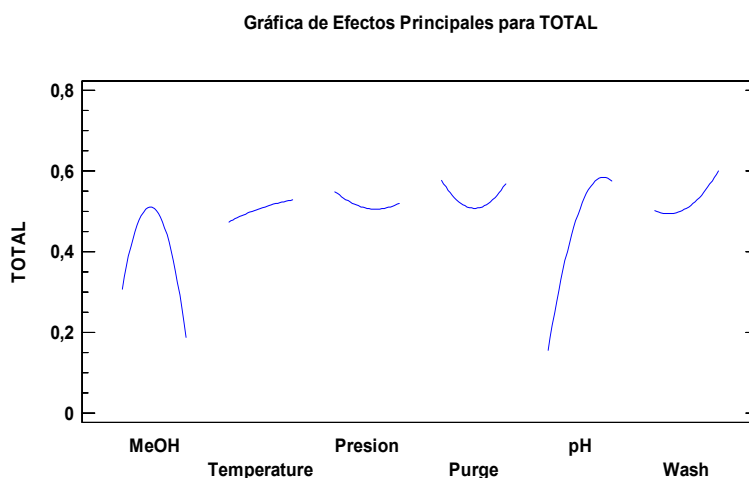


Figura 20. Gráfico de efectos principales para la respuesta antocianinas totales.

Entre los diagramas de efectos principales para la respuesta antocianinas totales y de compuestos fenólicos totales se observa una cierta similitud apreciándose una diferencia mínima en las condiciones de extracción en ambos casos. Dicha semejanza se verifica en los valores de las condiciones de extracción óptimas (Tabla 12), donde se observan valores bastante semejantes.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
% MeOH	49
Temperatura °C	100
Presión (atm)	50
Tiempo de purga (s)	30
pH	6.67
% volumen de lavado	100

*Tabla 12. Condiciones óptimas de extracción para las antocianinas totales mediante PLE.*

A la vista de la tabla, se observa que como variables más representativas, debe de emplearse en torno a un 49% de metanol en agua, a un pH próximo a 6.67, para extraer la mayor proporción de antocianinas totales.

#### **6.2.3.1 Tiempo de extracción**

Nuevamente, tras obtener las condiciones óptimas de extracción, se procedió a determinar el tiempo óptimo de extracción bajo estas condiciones. Para ello se realizaron por duplicado diversas extracciones a distintos tiempos de extracción: 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Los extractos obtenidos fueron analizados mediante UHPLC-UV-Vis para obtener su composición en antocianinas totales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21 donde se representa los miligramos de antocianinas obtenidas por gramo de jaboticaba en función del tiempo de extracción.

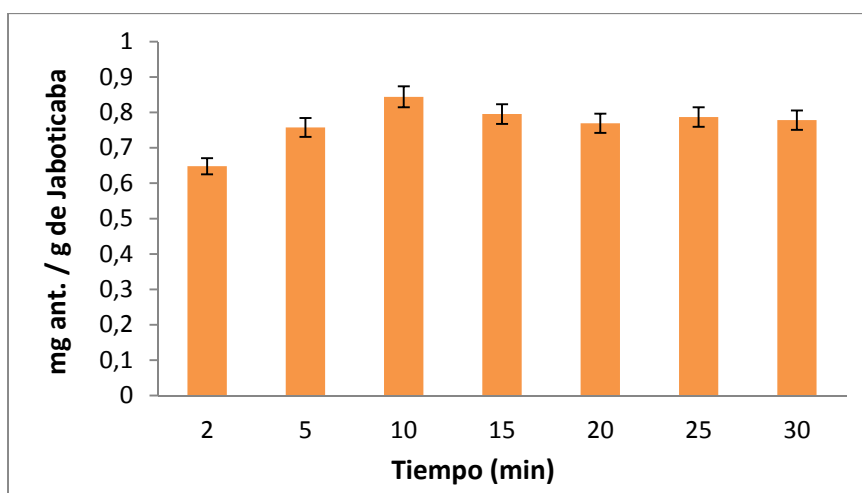


Figura 21. Antocianinas extraídas en función del tiempo de extracción mediante PLE.

De igual manera a como ocurría en la extracción de compuestos fenólicos totales, se observa que la extracción máxima de antocianinas se produce a un tiempo de 10 minutos. A partir de este momento se observa una cierta disminución en la cantidad total de antocianinas, debido seguramente a la degradación de estos compuestos. Por tanto, se obtiene de nuevo, que el tiempo óptimo de extracción de estos compuestos es de 10 minutos.

#### 6.2.2.2. Repetitividad y reproducibilidad del método

Tras la obtención de los parámetros óptimos de extracción se ha realizado un estudio de la repetitividad y reproducibilidad del método desarrollado para antocianinas totales presentes en la jaboticaba. La forma de ejecución ha sido tal cual se realizó para compuestos fenólicos totales. Se realizaron distintas extracciones en las condiciones óptimas, 12 extracciones consecutivas en un mismo día para la repetitividad y para el estudio de la reproducibilidad se hicieron 9 extracciones por día en otros dos días distintos (30 extracciones en total). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 13.

PARÁMETRO	REPETITIVIDAD	REPRODUCIBILIDAD
Media (mg ant / g Jaboticaba)	0.844	0.842
Desviación estándar	0.027	0.029
Desviación estándar relativa (%)	3.24	3.51

Tabla 13. Parámetros estadísticos del estudio de repetitividad y reproducibilidad.

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que el método desarrollado presenta una repetitividad y reproducibilidad óptimas ( $DER < 5\%$ ).

### 6.3. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS A MUESTRAS REALES

Una vez desarrollados los distintos métodos de extracción de antocianinas totales y de compuestos fenólicos totales con las dos técnicas de extracción estudiadas, se han aplicado a muestras reales para evaluar la utilidad y aplicabilidad de los métodos desarrollados.

Para este estudio se han empleado dos matrices, elaboradas a partir de la jaboticaba (una pulpa de jaboticaba y una mermelada). Las dos muestras han sido conservadas en el congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron sometidas a las cuatro técnicas de extracción desarrolladas durante este proyecto en las condiciones óptimas tanto para antocianinas como para compuestos fenólicos totales.

#### 6.3.1. Extracción de compuestos fenólicos totales

Como se ha comentado anteriormente, se ha empleado la técnica de extracción asistida por ultrasonidos y la técnica de extracción mediante fluidos presurizados desarrolladas y optimizadas para la extracción de compuestos fenólicos totales para extraer estos compuestos en las dos matrices estudiadas. En la Figura 22 se representa la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos.

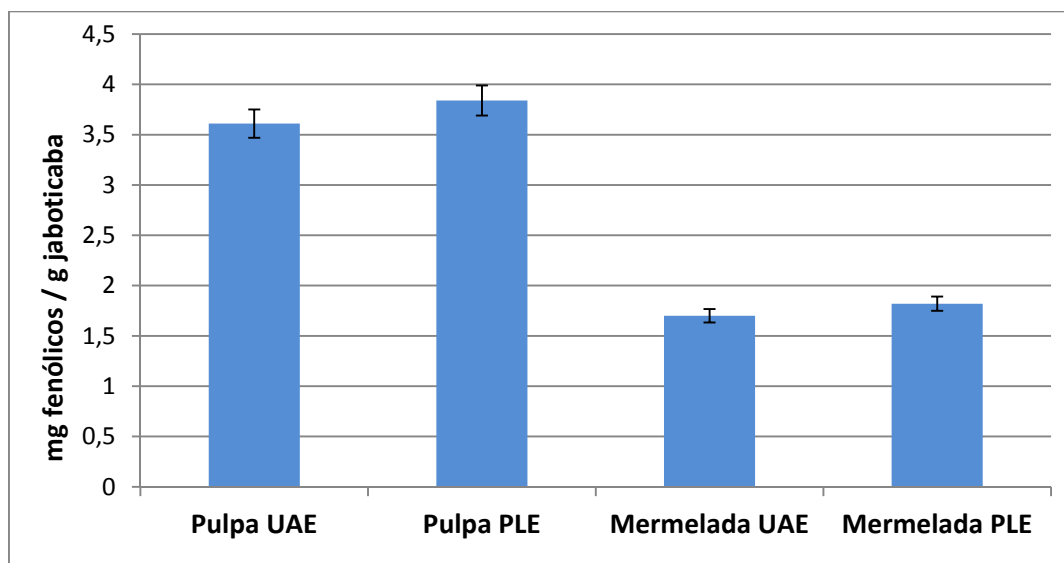


Figura 22. Compuestos fenólicos totales extraídos en las distintas muestras de jaboticaba.

Como se observa en la Figura 22, se obtiene que no hay diferencias significativas entre las dos técnicas de extracción desarrolladas a la hora de extraer los compuestos fenólicos totales de la jaboticaba (ver barras de error). A pesar de ello, visualmente se observa que se extrae mayor cantidad de compuestos fenólicos empleando la extracción mediante fluidos presurizados (para las dos matrices). Esto puede ser debido a la diferencia que presentan ambas técnicas en cuanto a la extracción y recolección del extracto. La extracción mediante fluidos presurizados es una técnica que por lo general presenta mejores resultados que la extracción asistida por ultrasonidos. Esto es debido a diversos factores, como es que emplea en la extracción temperaturas y presiones mayores a la que se emplean en ultrasonidos.

Otra causa se debe a la atmósfera que se encuentra en contacto durante la extracción. Mientras que en UAE la muestra se encuentra en contacto directo con el aire (atmósfera con oxígeno, propiedades oxidantes), en PLE, toda la extracción se realiza en ausencia de oxígeno, estando siempre bajo atmósfera inerte de  $N_2$ , evitando posibles oxidaciones de la muestra.

Por último cabe también señalar la mayor eficacia en el proceso de lavado de la muestra extraída, así como su secado. De esta forma la PLE es una técnica mucho más eficiente en el lavado de la muestra una vez extraída, además de que una vez que la muestra ha sido lavada con disolvente puro, pasa durante un tiempo determinado una corriente de  $N_2$  que seca prácticamente la muestra. Por el contrario, en UAE, este proceso es manual, y la muestra siempre queda algo húmeda, por lo que el proceso de lavado nunca será tan eficiente.

Se observa además, como era de esperar, que la pulpa de jaboticaba posee una cantidad bastante superior de compuestos fenólicos totales que la mermelada, debido a la mayor concentración de jaboticaba que presenta la pulpa (100%) con respecto a la mermelada ( $\approx 40\%$ ).

### **6.3.2. Extracción de antocianinas totales**

De igual manera a como se ha realizado con los compuestos fenólicos totales, se han aplicado las dos técnicas de extracción desarrolladas para antocianinas totales a las dos matrices de jaboticaba. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 23.

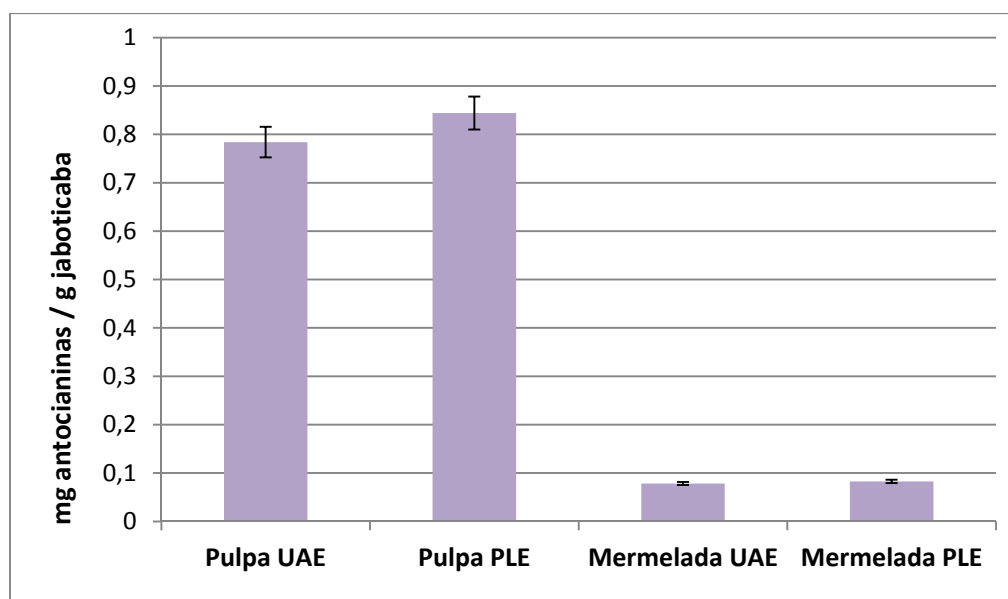


Figura 23. Antocianinas totales extraídas en las distintas muestras de jaboticaba.

Como se observa en la Figura 23, aunque no haya diferencias estadísticamente significativas a la hora de extraer las antocianinas totales en ambas muestras con los dos métodos de extracción desarrollados, visualmente se puede observar como la extracción mediante fluidos presurizados, al igual que ocurría con los compuestos fenólicos totales, extrae una mayor cantidad de antocianinas que la extracción asistida por microondas. Como se comentó anteriormente, esto puede ser debido a la mayor eficacia que puede presentar la técnica de extracción mediante fluidos presurizados (mayores presiones, temperaturas, empleo de atmósfera de  $N_2$  y mayor eficacia en el lavado y secado de la muestra una vez extraída).

De igual manera, se observa que la pulpa de jaboticaba presenta una cantidad muy superior de antocianinas que la mermelada. Esto es debido a la mayor proporción de jaboticaba en la pulpa (100%), respecto a la mermelada ( $\approx 40\%$ ), aparte de la degradación de antocianinas que se produce en la elaboración de la mermelada (tratamiento, pasteurización, etc.) y durante su almacenamiento hasta su consumo. Esta degradación es mucho más acusada en compuestos como antocianinas que en compuestos fenólicos en general, ya que las antocianinas aunque son también compuestos fenólicos son bastante más inestables que los compuestos fenólicos en general.

## 7. CONCLUSIONES

- Se han desarrollado y optimizado cuatro métodos de extracción, mediante la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción mediante fluidos presurizados (PLE), tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas totales.
- En la determinación de las condiciones óptimas de extracción para la técnica de extracción asistida por ultrasonidos, se ha obtenido que tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas totales, el parámetro más influyente en la extracción ha sido el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción. En ambos métodos, el tiempo óptimo de extracción ha sido de 10 minutos.
- En la determinación de las condiciones óptimas de extracción para la técnica de extracción mediante fluidos presurizados, se ha obtenido que tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas totales, los parámetros más influyen en la extracción han sido el pH del disolvente, así como el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción. En ambos métodos, el tiempo óptimo de extracción ha sido también de 10 minutos.
- Los cuatro métodos desarrollados han presentado una alta repetitividad y reproducibilidad tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas totales ( $DER < 0.5\%$ ).
- Se ha demostrado la aplicabilidad de dichos métodos en matrices de alimentos que están compuestos por jaboticaba (pulpa y una mermelada de jaboticaba).
- Tras la aplicación a muestras reales que contienen en su composición jaboticaba, se determinó que la extracción mediante fluidos presurizados es más eficiente que la extracción asistida por ultrasonidos.

## 8. REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Shi-Biao Wu , C. Largo , E. J. Kennelly. “Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil”. Food Research International, 54, **2013**, 148-159.
- <sup>2</sup> A. V. Leite-Lagatti, A. G. Batista, N. Romanelli, V. Dragana, A. Castro Marques, L. G. Malta, M. F. Riccio, M. Nogueira Eberlin, A. R. T. Machado, L. B. de Carvalho Silva, A. L. T. Gois Ruiz, J. E. de Carvalho, G. M. Pastore, M. R. Maróstica Junior. “Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities”. Food Research International, 49, **2012**, 596-603.
- <sup>3</sup> Leite, A. Malta, L. G. Maróstica, M. R. Júnior. “Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg)”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, **2011**, 2277-2283.
- <sup>4</sup> J. H. Yoon, S. J. Baek. “Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties”. Yonsei Medical Journal, 46, **2005**, 585–596.
- <sup>5</sup> Z. Zdunczyk, S. Frejnagel, M. Wroblewska, J. Juskiewicz, J. Oszmianski. “Biological activity of polyphenols extracts from different plant sources”. Food Research International, 35, **2000**, 183–186.
- <sup>6</sup> A. L. A. Vendramini, L. C. Trugo. “Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*) at three stages of maturity”. Food Chemistry, 71, **2000**, 195-198.
- <sup>7</sup> M. E. Olsson, K. E. Gustavsson, S. Andersson, A. Nilsson, R. D. Duan. “Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidants levels”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, **2004**, 7264 -7271.
- <sup>8</sup> K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya. “Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships”. Journal of Nutritional Biochemistry, 13, **2002**, 572- 584.
- <sup>9</sup> Y. S. Moreno, J. J. P. Alonso, G. V. Carrillo, F. A. Cuevas, G. A. Velázquez-Cardelas. “Anthocyanins and Antioxidant activity in maize grains (*Zea mays* L.) of chalqueño Elotes, Elotes Cónicos and Bolita races”. Agrociencia, 46, **2012**, 693-706.
- <sup>10</sup> J. F. Tortajada, O. B. Tornero, J. G. Castell, J. A. Ortega, J. A. López. “Dietetic Factors Associated with prostate cancer. Protective effects of Mediterranean diet”. Actas Urológicas Españolas, 36, **2012**, 239-245.



- <sup>11</sup> D. T. Santos, P. C. Veggi, M. A. A. Meireles. "Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation". Journal of Food Engineering, 101, **2010**, 23 -31.
- <sup>12</sup> K. J. Li, Z. Wu, T. Jensen, G.S. Schauss, A. G. Wu. "Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.)". Food Chemistry, 122, **2010**, 610-617.
- <sup>13</sup> A. C. M. S. Gouvêa de Araujo, M. C. P. Schulz, D. F. Pacheco, S. Godoy, R. L. O. Cabral. "Isolamento de padrões de antocianinas (cianidina-3-o-glucosídeo e cianidina -3-o-rutinosídeo) de açaí liofilizado (*Euterpe oleraceae* Mart.) por CLAE | [Anthocyanins standards (cyanidin-3-o-glucoside and cyanidin-3-o-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC]". Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 32, **2012**, 43-46.
- <sup>14</sup> D. T. Santos, M. A. A. Meireles. "Optimization of bioactive compounds extraction from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO<sub>2</sub>". Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12, **2011**, 398-406.
- <sup>15</sup> C. Carrera, A. Ruiz-Rodríguez, M. Palma Barroso. "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes". Analytica Chimica Acta, 732, **2010**, 100-104.
- <sup>16</sup> M. K. Khan, M. Abert-Vian, O. Dangles, F. Chemat. "Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis*) peel". Food Chemistry, 119, **2010**, 851-858.
- <sup>17</sup> P. Santos, A. C. Aguilar, G. F. Barbero, C. A. Rezende, J. Martinez. "Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum Frutescens* L.) assisted by ultrasound". Ultrasonics Sonochemistry, 22, **2015**, 78-88.
- <sup>18</sup> J. L. Pasquel Reáteguia, A. P. da Fonseca Machadoa, G. F. Barbero, C. A. Rezende, J. Martínez. "Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound". The Journal of Supercritical Fluids, 94, **2014**, 223-233.
- <sup>19</sup> M. J. Simiriotis, J. Bórquez, G. Schmeda-Hirschmann. "Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*". Food Chemistry, 139, **2013**, 289-299.

- <sup>20</sup> G. R. Montañez, J. A. Ragazzo-Sánchez, M. C. Santoyo, G. Velázquez-de la Cruz, J. A. Ramírez de León, A. Navarro-Ocaña. "Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.)". Food Chemistry, 159, **2014**, 267-272.
- <sup>21</sup> M. Chen, Y. Zhao, S. Yu. "Optimization of ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses". Food Chemistry, 172, **2015**, 543-550.
- <sup>22</sup> B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl. "Accelerated solvent extraction: a Technique for sample preparation". Analytical Chemistry, 68, **1996**, 1033-1039.
- <sup>23</sup> J. Paes, R. Dotta, G. F. Barbero, J. Martínez. "Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids". The Journal of Supercritical Fluids, 95, **2014**, 8-16.
- <sup>24</sup> A. P. D. F. Machado, J. L. Pasquel-Reategui, G. F. Barbero, J. Martinez. "Pressurized liquid extraction of bioactive from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods". Food Research International, **2014**, DOI: 10.1016/j.foodres.2014.12.042. In Press.
- <sup>25</sup> Y. F. Shang, S. M. Kim, B. Um. "Optimisation of pressurized liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves". Food Chemistry, 154, **2014**, 164 -170.
- <sup>26</sup> J. Liu, M. Sandahl, P. J. R. Sjoberg, C. Turner. "Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: Extraction of polyphenols in red onions". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, **2014**, 441-445.
- <sup>27</sup> V. Spinola, J. Pinto, P. C. Castilho. "Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity". Food Chemistry, 173, **2015**, 14-30.
- <sup>28</sup> C. Florian, J. Trichterborn, R. Carle. "Characterisation of anthocyanins-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses". Food Chemistry, 94, **2006**, 296-309.
- <sup>29</sup> P. G. Hoffman, M. C. Lego, W. G. Galletto. "Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reversephase high-pressure liquid chromatography". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31, **1983**, 1326-1330.

- <sup>30</sup> S. Govindaraghavan. "Pharmacopeial HPLC identification methods are not sufficient to detect adulterations in commercial bilberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts". *Fitoterapia*, 99, **2014**, 124-138.
- <sup>31</sup> A. A. Karaçelik, M. Kucuk, Z. Iskefiyeli, S. Aydemir, S. De Smet, B. Miserez, P. Sandra. "Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods". *Food Chemistry*, 175, **2015**, 106-114.
- <sup>32</sup> A. G. Batista, S. A. Lenquiste, C. B. Betim Cazarin, J. K. da Silva, A. L. Ferreira. "Intake of Jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced". *Food Research International*, 49, **2012**, 596-603.
- <sup>33</sup> G. D. Mercali, P. D. Gurak, F. Schmitz, L. D. F. Marczak. "Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanins degradation during ohmic heating of jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora*) juice". *Food Chemistry*, 171, **2015**, 200-205.
- <sup>34</sup> J. Li, X. He, M. Li, W. Zhao, L. Liu, X. Kong. "Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC". *Food Chemistry*, 176, **2015**, 106-114.
- <sup>35</sup> T. H. Soininen, N. Jukarainen, S. O. K. Auriola, R. J. Tiitto, R. Karjalainen, J. J. Vepsäläinen. "Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC-MS". *Food Chemistry*, 165, **2014**, 499-505.
- <sup>36</sup> I. M. Abu-Reidah, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez. "Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus*) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS". *Food Chemistry*, 141, **2013**, 2269-2277.
- <sup>37</sup> S. Hogan, H. Chung, L. Zhang, J. Li, Y. Lee, Y. Dai, K. Zhou. "Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanins-rich extract from açai". *Food Chemistry*, 154, **2014**, 71-77.
- <sup>38</sup> G. Pepe, E. Sommella, M. Manfra, M. De Nisco, G. C. Tenore, A. Scopa, A. Sofo, S. Marzocco, S. Adesso, T. Novellino, P. Campiglia. "Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.)". *Food Chemistry*, 167, **2015**, 153-161.

- <sup>39</sup> G. A. Bataglion, F. M. A. da Silva, M. N. Eberlin, H. H. F. Koolen. “Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.F.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry”. Food Research International, 66, **2014**, 396-400.
- <sup>40</sup> V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós. “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent”. Methods in Enzymology, 299, **1999**, 152-178.
- <sup>41</sup> M. J. Martelo-Vidal, M. Vázquez. “Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-Vis-NIR spectroscopy and chemometrics tools”. Food Chemistry, 158, **2014**, 28-34.
- <sup>42</sup> M. V. S. C. D. Stewart Staffan, C. A. S. V. E. J. Kimmo Rumpunen. “Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date”. Food Chemistry, 172, **2015**, 135-142.
- <sup>43</sup> E. F. Andrade, R. L. de Souza, L. N. Ellendersen, M. L. Masson. “Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallantgus sonchifolius*)”. Industrial Crops and Products, 62, **2014**, 499-506.
- <sup>44</sup> F. M. Yilmaz, M. Karaaslan, H. Vardin. “Optimization of extraction parameters on the isolation of phenolic compounds from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pomace”. Journal of Food Science and Technology, **2014**, DOI: 10.1007/s13197-014-1345-3. In press.
- <sup>45</sup> V. Spinola, J. Pinto, P. C. Castilho. “Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity”. Food Chemistry, 173, **2015**, 14 -30.
- <sup>46</sup> A. Gordon, A. P. Gil Cruz, L. M. Correa Cabral, S. Cordeiro de Freitas, C. M. Araujo Dib Taxi, C. M. Donangelo, R. de Andrade Mattioto, M. Friedrich, V. Martins da Matta, F. Marx. “Chemical characterization and evaluation of Antioxidant properties of açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart) during ripening”. Food Chemistry, 133, **2012**, 256-263.
- <sup>47</sup> S. Lee, E. S. Jung, S. G. Do, J. M. Song, C. H. Lee. “Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium spp.*)”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, **2014**, 142-147.

<sup>48</sup> A. Slatnar, M. M. Petkovsek, F. Stampar, R. Veberic, A. Solar. “HPLC-MS identification and quantification of phenolic compounds in hazelnut kernels, oil and bagasse pellets”. Food Research International, 64, **2014**, 783-789.

<sup>49</sup> A. G. Vasconcelos Costa, D. F. Garcia-Diaz, P. Jimenez, P. I. Silva. “Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries”. Journal of Functional Foods, 5, **2013**, 539 -549.

<sup>50</sup> L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wilstrom, S. Wold. “Design of experiments. Principles and applications”. Umetrics AB, **2008**, Umea, Suecia.

## 9. APÉNDICES

### ANEXO I. Espectros de masas de antocianinas en jaboticaba.

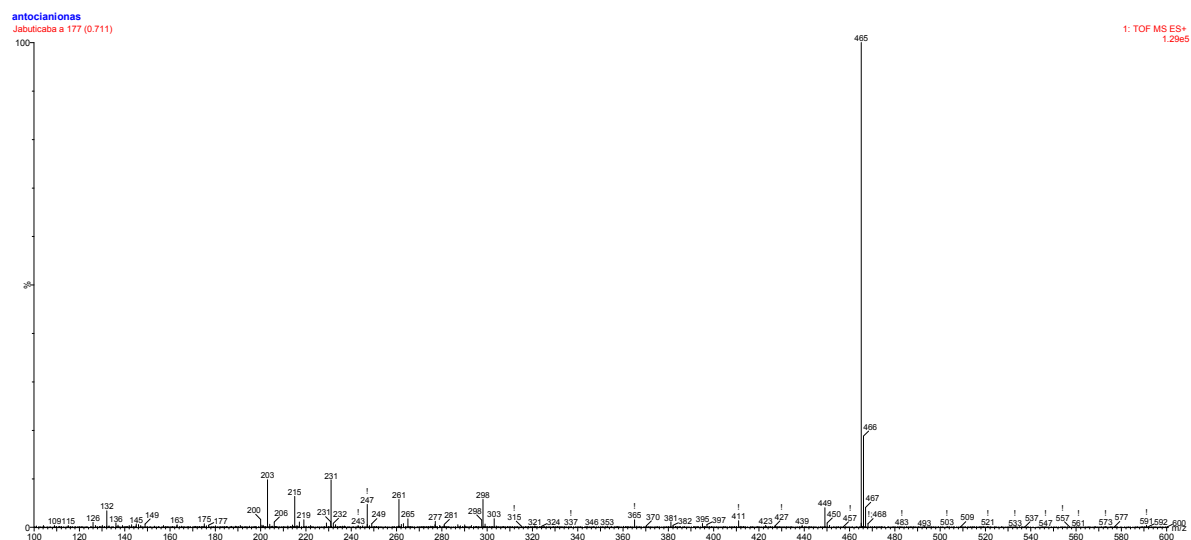


Figura 24. Espectro de masas de la delphinidina-3-O-glucósido.

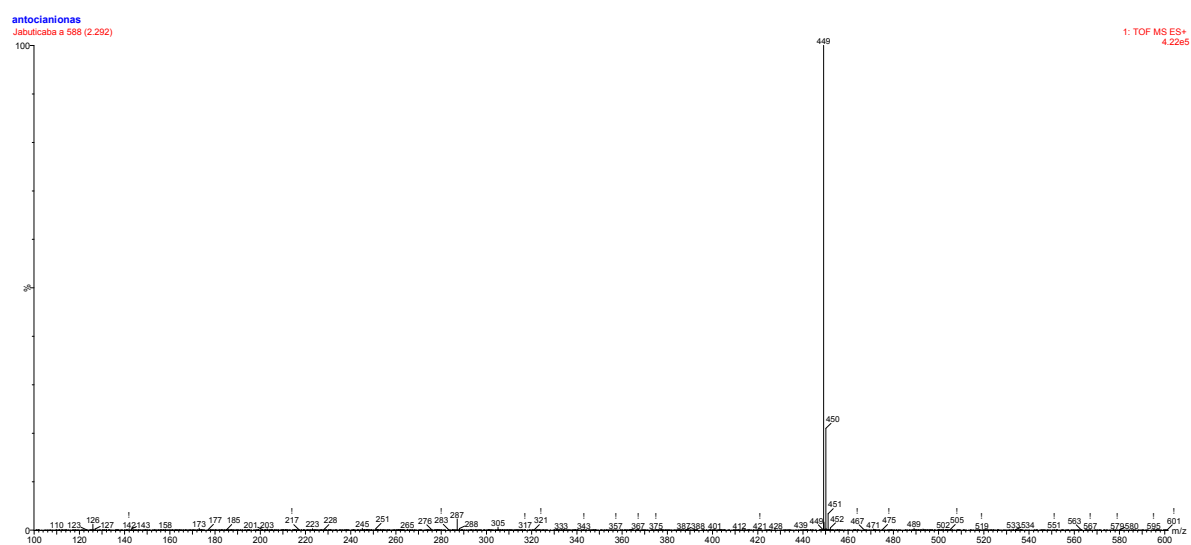


Figura 25. Espectro de masas de la cianidina-3-O-glucósido.

**ANEXO II. Diseño de experimentos de Box-Behnken para seis variables.**

<b>BLOQUE</b>	<b>MeOH</b>	<b>Temperature</b>	<b>Amplitude</b>	<b>Cycle</b>	<b>pH</b>	<b>Ratio</b>
1	0	0	-1	0	-1	-1
1	0	0	1	0	-1	-1
1	0	0	-1	0	1	-1
1	0	0	1	0	1	-1
1	0	0	-1	0	-1	1
1	0	0	1	0	-1	1
1	0	0	-1	0	1	1
1	0	0	1	0	1	1
1	0	-1	0	-1	-1	0
1	0	1	0	-1	-1	0
1	0	-1	0	1	-1	0
1	0	1	0	1	-1	0
1	0	-1	0	-1	1	0
1	0	1	0	-1	1	0
1	0	-1	0	1	1	0
1	0	1	0	1	1	0
1	-1	0	-1	-1	0	0
1	1	0	-1	-1	0	0
1	-1	0	1	-1	0	0
1	1	0	1	-1	0	0
1	-1	0	-1	1	0	0
1	1	0	-1	1	0	0
1	-1	0	1	1	0	0
1	1	0	1	1	0	0
1	0	-1	-1	0	0	-1
1	0	1	-1	0	0	-1
1	0	-1	1	0	0	-1
1	0	1	1	0	0	-1
1	0	-1	-1	0	0	1
1	0	1	-1	0	0	1
1	0	-1	1	0	0	1
1	0	1	1	0	0	1
1	-1	-1	0	0	-1	0
1	1	-1	0	0	-1	0
1	-1	1	0	0	-1	0
1	1	1	0	0	-1	0
1	-1	-1	0	0	1	0
1	1	-1	0	0	1	0
1	-1	1	0	0	1	0
1	1	1	0	0	1	0

<b>1</b>	-1	0	0	-1	0	-1
<b>1</b>	1	0	0	-1	0	-1
<b>1</b>	-1	0	0	1	0	-1
<b>1</b>	1	0	0	1	0	-1
<b>1</b>	-1	0	0	-1	0	1
<b>1</b>	1	0	0	-1	0	1
<b>1</b>	-1	0	0	1	0	1
<b>1</b>	1	0	0	1	0	1
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0